

La zona híbrida pirenaica de
Chorthippus parallelus parallelus y
Chorthippus parallelus erythropus
(Orthoptera)

Jonás Sarasa Marcuello

Tesis Doctoral
Universidad Autónoma de Madrid
Año 2012

La zona híbrida pirenaica de *Chorthippus parallelus parallelus* y *Chorthippus parallelus erythropus* (Orthoptera)

Memoria que presenta Jonás Sarasa Marcuello para optar al grado de Doctor en Ciencias (Biológicas) por la Universidad Autónoma de Madrid con Mención Europea.

Jonás Sarasa Marcuello

Vº Bº del Director de la tesis doctoral

Vº Bº de la Directora de la tesis doctoral

Dr. José Luís Bella Sombria
Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

Dr. Begoña Fernández Calvín
Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

La investigación ha sido financiada por el Ministerio de Educación y Ciencia mediante la concesión de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) (BES-2007-17352 a Jonás Sarasa Marcuello. Cumpliéndose dos años de becario FPI y dos años de contrato en prácticas como Personal Docente e Investigador en Formación (PDIF) en la Universidad Autónoma de Madrid. La investigación ha sido subvencionada por los proyectos CGL2009-08380/BOS y CGL2005-02898 del Ministerio de Ciencia e Innovación. Además, se agradece el permiso para recoger las muestras a la Junta de Andalucía, al Gobierno de Aragón y al Parc Pyrénéés de Francia.

*A María,
a mis padres y
a mis hermanas,
los pilares de mi vida y de mis sueños.*

Agradecimientos

Es imposible agradecer a todas las personas que, en diferentes momentos, han cedido parte de su tiempo para ayudarme en esta etapa de mi vida, pues son muchas, pero no quiero dejar de hacerlo en estas páginas a aquellos que de una manera más directa han hecho posible el camino.

Gracias...

...a Pepe, por darme la opción de entrar en el mundo de la investigación y abrirme la puerta del laboratorio.

...a Begoña por compartir con Pepe la dirección y supervisión de esta tesis doctoral.

...a la gente del laboratorio, a los que siguen y a los que se fueron: Mario, Paqui, Carmen, Joaquina, Jaime, Pepe M., Carlos, Rosa, Paloma, Javi y, muy especialmente, a Miguel.

...a las tres doctoras de la universidad de Alcalá, Araceli, Esther y Yolanda, que me dieron veda y recursos para la pesca de cromosomas.

...a Domènec, Irene y Mar por la agradable estancia en Barcelona durante el curso de Filogenias y Genealogías de ADN, quién sabe si algún día viviremos en esa maravillosa ciudad.

...a Dmitry, que me acogió en su laboratorio de Oxford y me mostró el Monte Etna y la zona híbrida de *Senecio* que mantiene en sus laderas.

...a Graham, el primer escocés que conocí en Inglaterra, por introducirme en el análisis de los microsatélites, y junto con él, a Grażyna.

...a Tonya, la Paqui del laboratorio de Oxford.

...a Gill y Walaa, por tener el inglés que yo no tengo.

...a Dagan, por confiar en mi sin demostrar nada y ofrecerme un trabajo y por la flexibilidad que ha mostrado para que yo termine esta etapa.

...a los miembros de la *morrala*, una red social, pero no virtual, que día a día hacen más llevadero el exilio (gracias Boca, Salva, Aina, Bel, Mekón, Loreto, Enri, Mery, Olmo, Pedro, Marco, Ginebra, Gerardo, Cris y todos los demás).

...a Concha, Antonio y Álvaro por su apoyo, cariño y comprensión.

...a mis abuelos, porque, sin tener nada, le dieron todo a sus hijos y sus hijos a mí.

...a mis hermanas, Alma y Luz, que tienen la curiosidad que deberíamos tener todos.

...a mis padres, pues en gran medida, lo que soy y lo que no soy, es gracias a ellos. Por su apoyo incondicional y su esfuerzo por darme todo, pues han sido los mecenas de esta tesis, con sus manos y su corazón.

...a María, no tengo palabras para agradecerle todo lo que hace por mí, por ofrecerme su inmenso amor y su inagotable energía. Gracias por todas, que son muchas, las horas hipotecadas para esta tesis, sin ti no podría terminar ni esta ni ninguna etapa de mi vida. Te necesito a mi lado, pues eres mi amor y mi esperanza.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
Zonas híbridas	5
La zona híbrida de <i>Chorthippus parallelus</i>	7
Nueva aproximación para el análisis de la zona híbrida de <i>Chorthippus parallelus</i>	15
<i>Wolbachia</i>	17
<i>Wolbachia</i> y <i>Chorthippus parallelus</i>	21
OBJETIVOS	25
MATERIAL Y MÉTODOS	27
Muestreos	27
Obtención de preparaciones cromosómicas	31
Bandeado-C	31
Frecuencia de quiasmas	32
Morfología de las espermatidas	32
Hibridación <i>in situ</i> Fluorescente (FISH) de ADN ribosómico.....	32
Impregnación argéntica.....	34
Extracción de ADN	35
Amplificación de secuencias cortas repetidas (microsatélites) de <i>Chorthippus parallelus</i>	36
Amplificación de secuencias de <i>Wolbachia</i>	39
Secuenciación de productos de PCR	41
Análisis de microsatélites	41
Análisis de secuencias de <i>Wolbachia</i>	42
Análisis estadísticos.....	43
RESULTADOS	47
Caracterización de las poblaciones de <i>Chorthippus parallelus</i>	47
El cromosoma X.....	47
Los microsatélites.....	52
Caracterización de la infección por <i>Wolbachia</i> en la zona híbrida de <i>Chorthippus parallelus</i>	65
Caracterización de los supergrupos	65
Caracterización de la incidencia de infección por <i>Wolbachia</i> en las poblaciones de <i>Chorthippus parallelus</i>	69
Caracterización de las cepas de <i>Wolbachia</i> mediante un sistema multilocus	71
Efectos citogenéticos de <i>Wolbachia</i> en <i>Chorthippus parallelus</i>	79
Marcadores del cromosoma X de <i>Chorthippus parallelus</i> vs <i>Wolbachia</i>	79
<i>Wolbachia</i> y su efecto en la recombinación de <i>Chorthippus parallelus</i>	82
<i>Wolbachia</i> y su efecto en la espermatogénesis de <i>Chorthippus parallelus</i>	83

DISCUSIÓN	85
Caracterización de las poblaciones de <i>Chorthippus parallelus</i>	85
El cromosoma X.....	85
Los microsatélites.....	88
Caracterización de la infección por <i>Wolbachia</i> en la zona híbrida de <i>Chorthippus parallelus</i>	95
Caracterización de los supergrupos	95
Caracterización de la incidencia de infección por <i>Wolbachia</i> en las poblaciones de <i>Chorthippus parallelus</i>	96
Caracterización de las cepas de <i>Wolbachia</i> mediante un sistema multilocus	98
Efectos citogenéticos de <i>Wolbachia</i> en <i>Chorthippus parallelus</i>	101
Marcadores del cromosoma X de <i>Chorthippus parallelus</i> vs <i>Wolbachia</i>	101
<i>Wolbachia</i> y su efecto en la recombinación de <i>Chorthippus parallelus</i>	102
<i>Wolbachia</i> y su efecto en la espermatogénesis de <i>Chorthippus parallelus</i>	105
CONCLUSIONES	107
CONCLUSIONS	109
BIBLIOGRAFÍA	111
APÉNDICE 1	131
APÉNDICE 2	133
APÉNDICE 3	135
APÉNDICE 4	137
APÉNDICE 5	139
APÉNDICE 6	141

RESUMEN

Chorthippus parallelus parallelus y *Chorthippus parallelus erythropus* son dos subespecies de saltamontes que pueden diferenciarse por rasgos morfológicos, etológicos, citogenéticos y moleculares. Sus poblaciones muestran diferente distribución, *Chorthippus parallelus erythropus* es un endemismo ibérico y *Chorthippus parallelus parallelus* se encuentra ampliamente distribuido por el resto del continente europeo, pero coinciden en el Pirineo originando una “zona híbrida”, regiones de gran interés para el estudio de la dinámica de las poblaciones. Algunos individuos de esta especie están infectados por *Wolbachia pipientis*, una α -proteobacteria endosimbionte obligado que produce incompatibilidad citoplasmática en este ortóptero. Esta característica se ha postulado como una posible barrera reproductiva que afectaría a la evolución de las poblaciones de los organismos infectados.

En el presente trabajo se caracterizan poblaciones no estudiadas previamente dentro de una de las zonas de contacto de la zona híbrida. Para ello se ha recurrido al uso de marcadores citogenéticos utilizados en trabajos previos y de marcadores moleculares, microsatélites, nunca antes usados en esta zona híbrida. Igualmente, se ha estudiado la incidencia de la infección por *Wolbachia pipientis* y su diversidad, usando un sistema multilocus que permite clasificar las cepas presentes más allá del nivel de supergrupo. Finalmente, se han analizado los efectos de la bacteria en ciertos aspectos de la espermatogénesis de su hospedador. Todo esto con el objetivo de profundizar en la dinámica de las poblaciones de *Chorthippus parallelus* en la zona híbrida y estudiar el efecto de este agente bacteriano en dichas poblaciones.

Se ha podido constatar con los marcadores citogenéticos y moleculares que las poblaciones de *Chorthippus parallelus* en las nuevas zonas estudiadas siguen dinámicas acordes a las áreas vecinas. Se ha caracterizado, además, la estructura genética

poblacional, obteniéndose valores moderados de diferenciación genética (F_{st}) y altos niveles de endogamia (F_{is}).

Por otro lado, se ha detectado que la infección por *Wolbachia pipientis*, en las poblaciones analizadas, tiene una amplia distribución y es muy variada, pues se han identificado hasta 27 secuencias tipo (ST) diferentes agrupadas en 4 complejos. La distribución de éstos se muestra acorde con el carácter puro o híbrido de las poblaciones de Cp. Además, se ha comprobado que la presencia de esta bacteria está efectivamente asociada a ciertas anomalías en la espermatogénesis de este huésped.

ABSTRACT

Chorthippus parallelus parallelus and *Chorthippus parallelus erythropus* are two subspecies of grasshopper that can be differentiated by morphological, ethological, molecular and cytogenetic traits. Their populations show different distribution where *Chorthippus parallelus erythropus* is an Iberian endemism and *Chorthippus parallelus parallelus* is widely dispersed in the rest of Europe. They convene however in the Pyrenees originating a "hybrid zone", an area of great interest for the study of population dynamics. Some individuals of this species are infected by *Wolbachia pipientis*, an obligated endosymbiont α -proteobacteria which produces cytoplasmic incompatibility in this orthopteroid. This characteristic has been postulated as a potential reproductive barrier affecting population dynamics of infected organisms.

In the present work, newly studied populations of *Chorthippus parallelus* located in one of the contact areas of the hybrid zone are characterised by the use of previously described cytogenetic markers and novel molecular markers, microsatellites, never used before in this hybrid zone. Additionally, the incidence of *Wolbachia pipientis* infection and its strain diversity is studied using a multilocus system that allows the classification of strains beyond supergroup. The possible effects of the bacteria on certain aspects of its host spermatogenesis are also examined. Inherently, the aim of the present study is to attain an insight into the population dynamics of *Chorthippus parallelus* in the hybrid zone and establishing the effect of *Wolbachia* in such populations.

The cytogenetic and molecular markers used confirm that the Cp populations in the new areas studied present dynamics consistent with those from neighbouring areas. Genetic structure characterisation analyses of these populations indicate moderate values of genetic differentiation (F_{st}) and high levels of inbreeding (F_{is}).

Furthermore, it was found that *Wolbachia pipientis* infection in the populations analysed in this study is widely distributed and very diverse, with 27 sequences type (ST) grouped into 4 different ST complexes identified. These complexes show a distribution pattern consistent with the pure or hybrid nature of the *Chorthippus parallelus* populations. Finally, an effective association between this bacterium and certain abnormalities in the host spermatogenesis can be established.

INTRODUCCIÓN

Zonas híbridas

El termino zonas híbridas hace referencia a aquellas regiones donde dos taxones diferenciados se encuentran, se cruzan y dejan descendencia híbrida (Barton y Hewitt, 1985; Harrison, 1990). Según Mayr (1970), estas zonas pueden surgir por un contacto primario o secundario. En el primer caso se trata de una zona híbrida entre dos grupos diferenciados en simpatría, es decir, dos taxones que evolucionan a partir de otro sin aislamiento geográfico; en el segundo se trata de una zona de contacto entre dos grupos diferenciados en alopatría, esto es dos especies o subespecies originadas por las diferencias acumuladas entre dos poblaciones de un mismo taxón que han sufrido aislamiento geográfico.

A lo largo de una zona híbrida aparecen gradientes de algunas de las características que diferencian a ambos taxones, a cada uno de estos gradientes se le denomina clina (Huxley, 1938). Para diferentes caracteres estas clinas pueden ser coincidentes, si presentan el mismo centro geográfico, y/o concordantes, si son de igual pendiente. Además, las zonas híbridas pueden verse también como regiones de introgresión, esto es cuando aparece en una población un alelo o rasgo propio de otra (Mayr, 1963).

Cuando surge una zona híbrida y se crea un flujo génico entre los dos taxones, pueden suceder dos cosas según el grado de divergencia entre ellos. Si las diferencias existentes entre los taxones son mínimas, se permite un intercambio génico fluido y las poblaciones tenderán a homogeneizarse (zona híbrida efímera). Por el contrario, si se está en una situación en la que hay un flujo génico limitado entre los taxones, la zona híbrida se mantendrá en el tiempo hasta que se refuercen esas diferencias entre los

distintos taxones (Barton, 2001; Burke y Arnold, 2001). Entre estas dos situaciones extremas pueden darse todo tipo de casos.

El extraordinario interés de estas situaciones intermedias es evidente pues permiten analizar *in situ* los procesos evolutivos en acción y ofrecen una excelente oportunidad para estudiar diferentes aspectos de la divergencia genética y especiación, flujo génico e introgresión, selección natural y adaptación, por lo que ya es clásico considerar a las zonas híbridas como “laboratorios naturales” (Hewitt, 1988) o “ventanas abiertas que permiten observar la evolución en marcha” (Harrison, 1990; Harrison, 1993).

Aunque existen ejemplos en diversos grupos de organismos, el número de zonas híbridas descubiertas y en estudio no es muy alto (especialmente en el reino animal), dado que, además, la región donde aparecen, o los organismos involucrados, no siempre permiten el análisis adecuado. Por esto, el estudio de una de estas situaciones merece generalmente gran interés en el ámbito de la biología evolutiva y suele rendir información muy valiosa, dado su potencial a extrapolarse a una mayoría de escenarios en los que, como decíamos anteriormente, no se dispone de tan magnífica oportunidad (Jiggins y Mallet, 2000; Howard y col., 2003). En este sentido allí donde se identifica una zona híbrida ésta se estudia en profundidad, hay buenos ejemplos tanto dentro del reino vegetal como en el animal (Brennan y col., 2009; Albrechtova y col., 2012; Poudel y col., 2012; Ross y col., 2012). El aporte de estas zonas a la biología evolutiva es muy importante pues permite el estudio de procesos evolutivos *in situ* (Hewitt, 2011). Las hay que tienen especial relevancia por lo que han aportado y siguen aportando en este sentido, como la zona híbrida de *Heliconius* (Arias y col., 2012; Pardo-Díaz y col., 2012), *Podisma* (Hewitt, 1975; Keller y col., 2008), *Gryllus* (Gray y Cade, 2000; Maroja y col., 2009), *Lampropholis* (Singhal y Moritz, 2012) o la de *Chorthippus parallelus* (Butlin y Hewitt, 1985a; Butlin y Hewitt, 1985b; Zabal-Aguirre y col., 2010).

La zona híbrida de *Chorthippus parallelus*

Chorthippus parallelus (Zetterstedt) (Cp) es un ortóptero de la familia Acrididae. El presente trabajo se centra en el estudio de las poblaciones de la zona de contacto entre dos de sus subespecies, *C. p. parallelus* (Cpp) y *C. p. erythropus* (Cpe). La primera está ampliamente distribuida por Europa Central y la segunda es un endemismo ibérico. El hábitat de este saltamontes son las praderas alpinas; de este modo, en la Península Ibérica se encuentra en ambientes de alta montaña bajando en altitud con el incremento de la latitud. La divergencia de estas subespecies pudo surgir por alopatría hace unos 9000 años (Hewitt, 2001). En esa época, como efecto de las glaciaciones, la distribución de las poblaciones ancestrales de *C. parallelus* estaría restringida a las penínsulas mediterráneas (Gomez y Lunt, 2007), quedándose aisladas geográficamente unas de otras. Esto posibilitaría una divergencia genética entre las diferentes poblaciones como efecto del aislamiento, la deriva génica y el efecto fundador entre las diferentes poblaciones. Tras la retirada de los hielos, estas poblaciones confinadas y diferenciadas, volverían a colonizar el continente, contactando entre sí y originando zonas híbridas. Éstas se formarían en los últimos lugares de recolonización, las principales cadenas montañosas (Pirineos, Alpes y Balcanes), pues los hielos se irían retirando primero de las latitudes más meridionales y altitudes más bajas (Hewitt, 2011).

Las dos subespecies estudiadas de *C. parallelus* confluyen en los Pirineos originando una zona híbrida (figura 1). La zona de contacto se limita a los valles transversales y zonas extremas de la cadena montañosa (Hewitt, 1988) pues el límite altitudinal de estos organismos se estima en 2000 metros aproximadamente. Varios estudios han señalado que los machos F1 de cruzamientos entre individuos puros de distinta subespecie en el laboratorio son viables pero prácticamente estériles, mientras que las hembras F1 son totalmente fértiles (Hewitt y col., 1987; Bella y col., 1990). Así pues, el origen de la zona híbrida podría ser el resultado de generaciones de retrocruzamientos entre hembras híbridas y machos puros. La esterilidad descrita en los machos F1 es un ejemplo más de la regla de Haldane, que propone que cuando hay problemas de fertilidad o de

viabilidad de la descendencia en cruzamientos de taxones diferenciados, estos afectan al sexo heterogamético (McDermott y Noor, 2011; Moehring, 2011; Schilthuizen y col., 2011). En este caso, los machos son XO y las hembras XX.

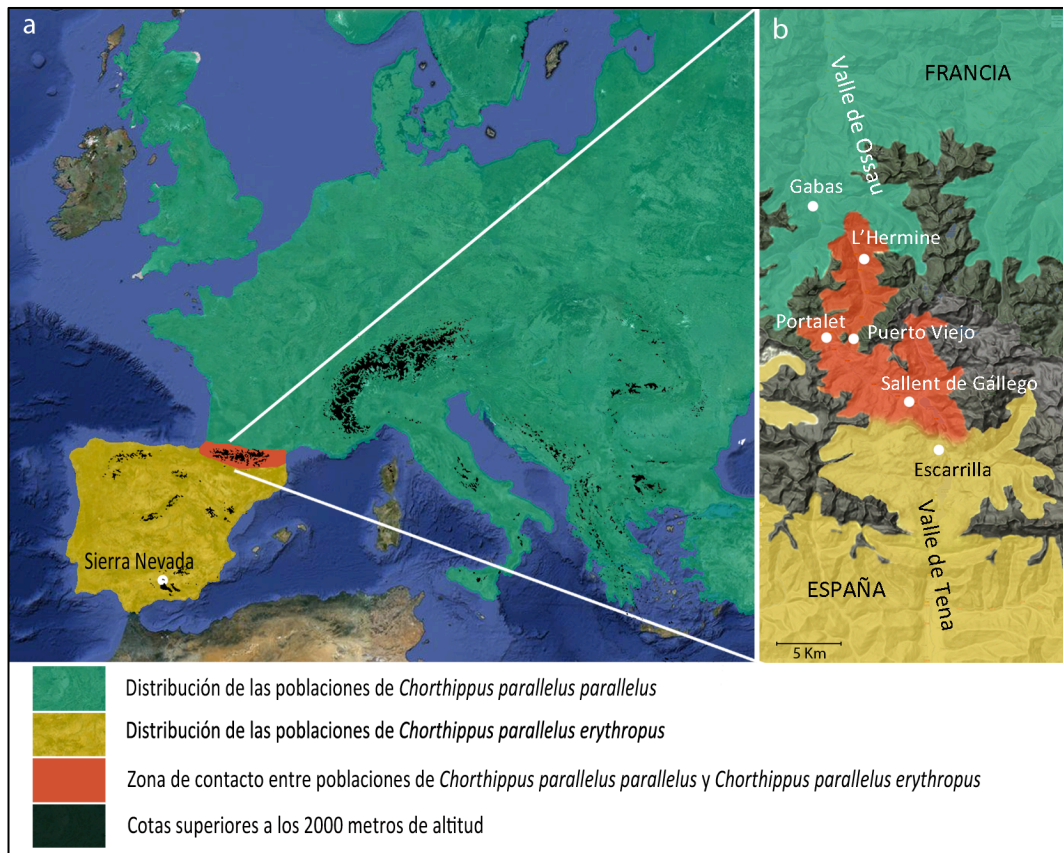


Figura 1. a) Área de distribución de las subespecies de *Chorthippus parallelus*. b) Detalle de la zona híbrida de Pirineos y localización de algunas de las poblaciones representativas de la zona de contacto en el valle de Tena (España) y el valle de Ossau (Francia).

Los individuos de las poblaciones europeas e ibéricas presentan diferencias que permiten caracterizar como puras, de una u otra subespecie, a aquellas poblaciones dónde el 100% de los individuos presentan esos rasgos. Esas diferencias son:

- Morfológicas: en los machos la diferencia principal entre subespecies es el número de púas en los peines estriduladores, menos de 120 en los machos de Cpp y más de 130 en

los de Cpe, mientras que en las hembras, las diferencias se centran en la longitud del ovopositor, menor de 0,95 mm y mayor de 1 mm respectivamente. Otra diferencia muy llamativa y que además da el nombre a la subespecie Cpe, es que la tibia de este taxón se presenta de un color rojizo (Reynolds, 1980; Butlin y Hewitt, 1985b).

- Etológicas: en este sentido las diferencias fundamentales son la longitud de sílaba del canto de llamada y el tiempo en los episodios de cortejo (Butlin y Hewitt, 1985a; Ritchie, 1990; Butlin y Ritchie, 1991).

- Enzimáticas: las poblaciones francesas presentan frecuencias elevadas de individuos con los alelos de la esterasa-2 $Es-2^0$ y $Es-2^1$ mientras que, en las poblaciones ibéricas, es el alelo $Es-2^2$ el que predomina (Butlin y Hewitt, 1985b).

- De ADN nuclear: se ha detectado que la mayoría de los haplotipos de la secuencia nuclear no codificante cpnl-1 presentes en las poblaciones españolas muestran una inserción de 5 pb (Cooper y Hewitt, 1993; Vázquez y col., 1994).

- Citogenéticas: Cpp y Cpp tienen el mismo cariotipo, pero presentan diferencias en la composición y distribución de la heterocromatina y en la localización de las regiones organizadoras del nucleolo (NOR) en el cromosoma X (Gosálvez y col., 1988; Bella y col., 1993) (figura 2).

Todos estos caracteres han sido utilizados para estudiar la dinámica poblacional de la zona híbrida y explorar su origen en diferentes zonas de contacto, como los valles en los Altos Pirineos y en los extremos oriental y occidental de la cordillera. En estos extremos, las poblaciones son predominantemente híbridas y es difícil detectar clinas o gradientes a lo largo de un transecto, a su vez difícil de delimitar geográficamente (Buño y col., 1994). Sin embargo, en los valles de los Altos Pirineos, donde las cotas más altas llegan a los 3000 metros de altitud y las poblaciones se localizan a lo largo de los valles transversales, se han podido identificar y detectar clinas para cada uno de los caracteres antes mencionados. Éstas han sido ampliamente estudiadas a los lados de dos collados, el puerto de Portalet y el puerto de la Quillane (Gosálvez y col., 1988; Butlin y col., 1991; Vázquez y col., 1994; Serrano y col., 1996).

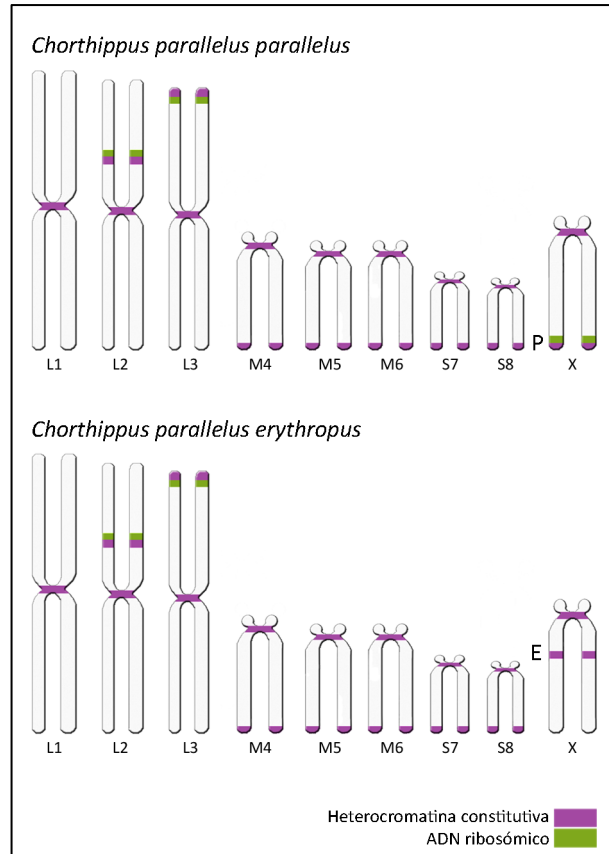


Figura 2. Ideograma correspondiente al complemento cromosómico de los ortópteros *Chorthippus parallelus parallelus* y *Chorthippus parallelus erythropus*. La heterocromatina distal presente en los cromosomas M4 a S8 puede presentar polimorfismos tanto de presencia/ausencia como de tamaño (John y Hewitt, 1966; Westerman, 1969, 1970; Gosálvez y col., 1988).

La distribución de las clinas para la mayoría de los caracteres estudiados se presenta en general con una pendiente suave y un centro coincidente entre ellas, muy próximos a los puntos más altos o collados que abren paso de una vertiente a otra (figuras 1 y 3). Pero hay un marcador asociado al cromosoma X de Cpp, la banda P, que en uno de los transectos, el del puerto de Portalet, unido por los valles de Tena (España) y de Ossau (Francia), presenta con un comportamiento distinto y llamativo que puede estar indicando la acción de la selección natural en estas poblaciones, algo que no parece que sea así en el transecto del puerto de la Quillane (Shuker y col., 2005a) (figura 3).

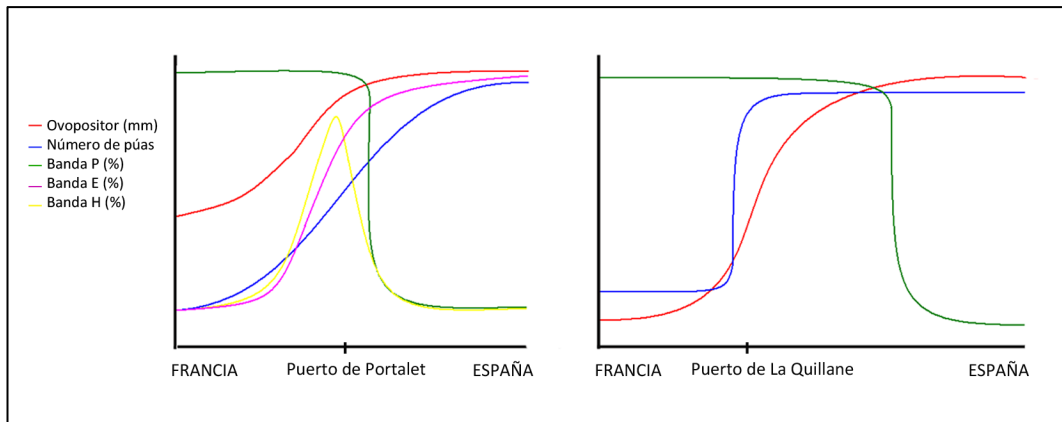


Figura 3. Clinas de la longitud del ovopositor, del número de púas y de las banda P, E y H en los transectos a través del puerto de Portalet, y de la Quillane. Tomado de Butlin y col., 1991; Ferris y col., 1993; Serrano y col., 1996.

De todos los marcadores estudiados, los citogenéticos ligados al cromosoma X son los que han mostrado diferencias más marcadas y llamativas en los estudios realizados en la zona híbrida de Cp. Estos ortópteros presentan un complemento cromosómico compuesto por tres pares de cromosomas largos submetacéntricos (L1-L3), tres pares de cromosomas medianos acrocéntricos (M4-M6), dos par de cromosomas pequeños acrocéntricos (S7 y S8) y el cromosoma X, que es a su vez acrocéntrico y de mayor tamaño que los medianos (figura 2). El determinismo cromosómico del sexo muestra el sistema habitual en estos organismos (hembras XX y machos X0) (Gosálvez y col., 1988).

Ligado al cromosoma X se han descrito y estudiado dos marcadores: la presencia de cistrones de ADNr a través de la actividad de regiones organizadoras del nucleolo (X-NOR) detectadas mediante tinción argéntica (Gosálvez y col., 1988) y mediante FISH con sondas de ADNr (Bella y col., 2007), y el patrón de bandeo-C (regiones heterocromáticas) (Gosálvez y col., 1988, Serrano y col., 1996). Se ha observado que las poblaciones que se encuentran fuera de la zona de contacto (individuos puros) presentan diferencias en estos marcadores (figura 2). Cpp tiene un X-NOR y dos bandas-C positivas en el cromosoma X, una centromérica (C) y otra distal o telomérica (P). Cpe

no presenta NOR asociado al cromosoma X y éste tiene la misma banda C centromérica pero, en lugar de una banda telomérica, presenta una subproximal (E) (Gosálvez y col. 1988).

Sin embargo, algunas de las poblaciones que se encuentran dentro de la zona híbrida presentan individuos con cromosomas X que pueden llevar la banda E, o la P, así como el resultado de la recombinación (bandas E y P simultáneas, o ausencia de ambas). Además, en determinadas poblaciones híbridas se ha observado, en este cromosoma X, una nueva banda subproximal más alejada del centrómero, la banda H, que también recombina con el resto. De este modo, se tiene, finalmente, tres bandas heterocromáticas que al recombinar entre ellas originan hasta 8 tipos de cromosomas diferentes (figura 4). Las clinas obtenidas a partir de estos marcadores tienen diferentes pendientes y centros, pero la más característica de todas es la de la banda P, pronunciada y con el centro muy desviado respecto al del resto de las clinas (Serrano y col., 1996) (figura 3).

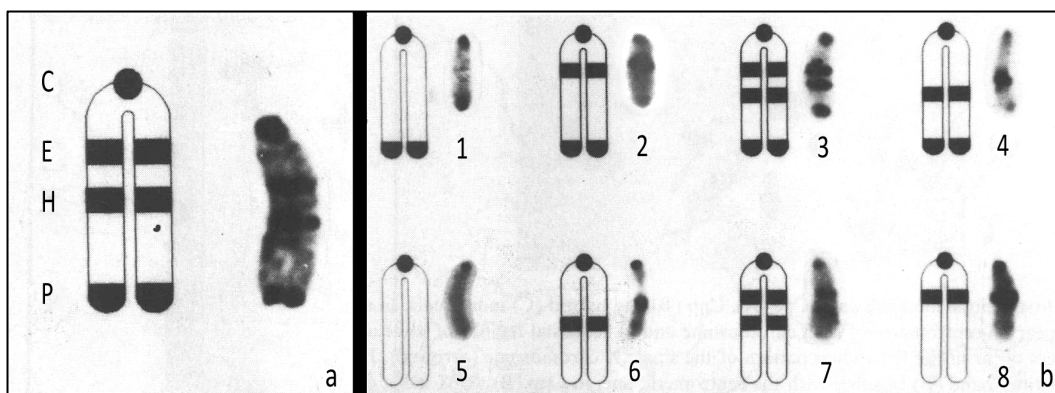


Figura 4. A) Diagrama y cromosoma X de *Chorthippus parallelus* con todas las bandas heterocromáticas descritas. B) Cromosomas X y su diagrama con los diferentes patrones de bandas C encontrados en individuos de *Chorthippus parallelus* en la zona de contacto de Portalet. 1 y 8 tipos parentales de *Chorthippus parallelus parallelus* y *Chorthippus parallelus erythropus*, respectivamente. 2-7 tipos derivados (posiblemente recombinantes). Tomada de Serrano y col. (1996).

L. Serrano en su Tesis Doctoral (1994) estudió en profundidad la distribución de los marcadores ligados al cromosoma X, a lo largo de 70 Km, en las poblaciones de Cp distribuidas a lo largo del Valle de Tena (España) y de Ossau (Francia), ubicados en los Altos Pirineos o Pirineos Centrales y unidos a través del Puerto de Portalet (figura 1). En ese estudio se caracterizaron citogenéticamente una serie de poblaciones de dichos valles, lo que permitió dar una idea clara de la estructura de la zona de contacto. En España, se identificaron como poblaciones puras de Cpe hasta Sallent de Gállego incluida, mientras que, en Francia, la última población en presentar el 100% de sus individuos el cromosoma X típico de Cpp fue Gabas, acotando la zona de contacto en un transecto de unos 12 Km. El resto de poblaciones entre estos dos extremos septentrional y meridional se mostraron como híbridas para este marcador, pues, aunque en diferentes proporciones, los individuos de estas poblaciones podían presentar tanto banda E, típica de Cpe, banda P, típica de Cpp o el resultado de la recombinación entre ellas en sus cromosomas X, así como, en algunos casos, la banda H citada anteriormente (figura 4)(Serrano y col. 1996).

La distribución de estas bandas a lo largo del transecto no se mostró al azar, si no en forma de clinas bien marcadas, aunque con características bien diferentes (figura 3). La banda E se mostró con una introgresión en la zona híbrida paulatina y suavizada, es decir, el descenso de la presencia de esta banda en las poblaciones híbridas era progresiva, con valores cercanos al 100% en las poblaciones de Formigal, las siguientes en el transecto después de Sallent de Gállego; alrededor del 50% en las poblaciones de Portalet y Cabaña Antigüa, ubicadas equidistantemente de los extremos del transecto; y en torno al 10% en las últimas poblaciones estudiadas, muy poco antes de la de Gabas, en L'Hermine. Sin embargo, Serrano y col. (1996) detectaron un comportamiento muy distinto en cuanto a la distribución de la banda P se refiere, algo que ya se había vislumbrado en trabajos anteriores (Gosalvez y col., 1990; Ferris y col., 1993). Este marcador tenía una introgresión fuerte en la zona híbrida desde las poblaciones francesas, mostrándose con valores muy cercanos al 100% hasta poblaciones muy meridionales, pero, a su vez con un súbito descenso en las poblaciones híbridas más cercanas a Sallent de Gállego. En apenas 2 Km, la banda P pasaba de presentarse en las

poblaciones del Corral de Mulas entre un 85% y un 100% de los individuos, a descender hasta un 10% en las poblaciones de Formigal. Este hecho, junto con que este comportamiento de la banda P no se hubiera detectado en otros lugares de contacto de la zona híbrida (Ferris y col., 1993; Buño y col., 1994), permitieron especular sobre la posibilidad de que alguna fuerza selectiva, independiente al gradiente geográfico de estas especies, estuviera actuando sobre este marcador (figura 3).

Todo este escenario ya se presenta como un modelo de gran valor para estudios evolutivos, pero es que Serrano y col. detectaron otra peculiaridad: la presencia de una nueva banda en el cromosoma X, intersticial como la E, pero más distal, que denominaron H (de híbrido). Este carácter se encuentra en el 100% de los individuos en las primeras poblaciones en la vertiente francesa después del puerto de Portalet, dispersándose hacia los extremos del transecto paulatinamente, hasta desaparecer en las poblaciones de Sallent de Gállego y Gabas (figuras 1 y 2). La presencia de caracteres o alelos “raros” específicos de los híbridos ya había sido descrita en varias zonas híbridas (Barton y Hewitt, 1985; Woodruff, 1989). De hecho, estos caracteres se han ido encontrando en diferentes zonas de contacto, tanto de especies animales como vegetales, y han producido un gran interés (Bradley y col., 1993; Schilthuizen y col., 1999, 2001; Lexer y col., 2006), entre otras cosas porque permiten caracterizar a los individuos híbridos. Hay cierta controversia entorno al origen de estos alelos, pero se piensa que son alelos que existen en las poblaciones puras a bajas frecuencias, ligados a combinaciones de genes que no intervienen en el aislamiento reproductivo. En las poblaciones híbridas estas combinaciones son las que presentan menor presión selectiva y, por tanto, estos genes, junto con los alelos ligados a ellos, aparecen en frecuencias mucho mayores que en las poblaciones puras (ver discusión: Schilthuizen y col., 2004; Seehausen, 2004a, 2004b).

Como se ha indicado anteriormente, no se encuentran poblaciones de Cp por encima de los 2000 metros y el transecto de los valles de Tena y Ossau está rodeado por montañas que superan esa altura. Este hecho implica que el flujo genético entre las diferentes poblaciones sólo pueda ser en un gradiente norte-sur, sur-norte. Sin embargo, la unión

entre los valles no se limita al puerto de Portalet, que se queda en los 1794 metros, existe otro punto de unión, el collado de Peiralún (1848 metros) también llamado el puerto Viejo de Sallent (figura 1). Las poblaciones de este paso entre Francia y España han sido poco estudiadas, de hecho, sólo hay dos trabajos que analizan muestras de ambos puertos. Uno de ellos estudia las clinas de caracteres morfológicos (Butlin y col., 1991) y el otro se centra exclusivamente en la banda P del cromosoma X (Ferris y col., 1993). En ninguno de los dos estudios se aprecian diferencias entre las clinas descritas a partir de las poblaciones del puerto Viejo de Sallent o de Portalet. En el caso de la clina para la banda P, de hecho, todas las poblaciones de los dos puertos se muestran con el 100% de los individuos con esta banda, mostrando que la introgresión de este carácter es homogénea por ambos pasos. Aun así, el número de muestras usadas en el estudio del marcador citogenético es bajo, en muchos casos las muestras por población no llegaban a los 10 individuos, por este motivo parece razonable reexaminar estas poblaciones y estudiar, además de la banda P, las bandas E y H.

Nueva aproximación para el análisis de la zona híbrida de *Chorthippus parallelus*

Aunque la zona híbrida de *Chorthippus parallelus* ha sido ampliamente estudiada, y de manera profunda en cuanto a la zona de Portalet se refiere, la mayor parte de los marcadores usados son poco polimórficos. Así pues, nuevos análisis con otras técnicas más resolutivas son necesarios para inferir la estructura de las poblaciones de este saltamontes en la zona híbrida. Existen diversos ejemplos de aproximaciones mediante marcadores moleculares polimórficos. De entre ellos, los más utilizados son las secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) y los microsatélites. Las primeras son secuencias de herencia estrictamente materna con una dinámica muy diferente a la de las secuencias nucleolares y, aunque polimórficas, presentan tasas de mutación inferiores a las de los microsatélites. Se ha estimado una tasa de mutación en estas

secuencias de $\mu = 6.2 \cdot 10^{-8}$ (Haag-Liautard y col., 2008), cuatro órdenes inferior a las de los microsatélites, $\mu = 4.5 \cdot 10^{-4}$ (Whittaker y col., 2003). Este hecho ha condicionado el uso de unas y otras en distintos tipos de análisis. Las secuencias de ADNmt, aunque también se utilizan para el estudio de poblaciones en pequeñas regiones, su uso más extendido es en filogeografía (Moritz, 1994; Kholodova, 2009) donde recurrir a marcadores excesivamente polimórficos podría llevar a error.

Los microsatélites son secuencias de ADN nuclear con repeticiones en tándem de uno a seis nucleótidos ubicadas en el genoma nucleolar de la mayoría de los taxones. Se denominan también SSR o STR, de sus siglas en inglés *simple sequence repeats* y *simple tandem repeats* respectivamente. Los microsatélites suelen tener una variación en su longitud de entre 5 y 40 repeticiones, aunque pueden encontrarse de mayor tamaño. Estas repeticiones suelen estar flanqueadas por secuencias conservadas, que son las que permiten que se puedan amplificar mediante PCR (Selkoe y Toonen, 2006). Su alta tasa de mutación proporciona una gran resolución para el análisis de poblaciones a pequeña escala, presentándose como una herramienta ideal para el estudio de la estructura genética de las poblaciones.

La función y evolución de estas secuencias ha sido ampliamente discutida en la literatura. Inicialmente se pensó que eran secuencias distribuidas al azar en un genoma y que no tenían ninguna función, pero conforme se han ido estudiando se ha podido observar que su distribución no es homogénea dentro del genoma de una especie ni entre genomas de diferentes especies. También se ha podido comprobar que pueden tener efectos en la expresión genética, en la organización de la cromatina o en el ciclo celular (Li y col., 2002).

A pesar de la incertidumbre en torno a la dinámica evolutiva y función de los microsatélites, su excepcional abundancia y su alta variabilidad han promovido que los microsatélites sean los marcadores genéticos más empleados en la última década. Se han usado fundamentalmente para realizar mapas genéticos, y también para intentar resolver un gran número de problemas biológicos a nivel de individuo (identidad, sexo),

familia (parentesco) o población (epidemiología o estructura genética) (Buschiazzi y Gemmell, 2006; Finger y Klank, 2010).

Por todo esto, pensamos que un estudio usando estos marcadores en la zona híbrida de Cp podría ayudar a definir de manera más precisa la estructura genética de las poblaciones en dicha zona, algo totalmente nuevo hasta la fecha. Los microsatélites permitirían, no sólo confirmar las clinas descritas, sino detectar la estructura genética, más allá de la geográfica o taxonómica de las poblaciones, así como valorar el flujo génico y estimar parámetros poblacionales que ayuden a interpretar el estado de las mismas.

Han sido muchos los trabajos publicados que identifican o utilizan los microsatélites en multitud de taxones. En una publicación reciente se recogen 283 nuevos microsatélites en 24 especies; entre ellos 9 específicos de Cp (Abercrombie y col., 2009). Estos microsatélites específicos de Cp han sido ya utilizados en poblaciones de Alemania (Wiesner y col., 2011), mostrando patrones muy interesantes que invitan a extender el uso de estos nuevos marcadores en la zona híbrida de dicho taxón en los Pirineos.

Pero no es sólo la necesidad de profundizar en el estudio de las poblaciones con otros métodos moleculares lo que anima a realizar nuevos análisis en dicha zona, las recientes evidencias de la presencia de *Wolbachia* en este ortóptero (Dillon y col., 2008; Martínez y col., 2009; Bella y col., 2010; Zabal-Aguirre y col., 2010; Sarasa y col., 2012) parecen indicar que hay otros agentes involucrados en la dinámica de las poblaciones de Cp.

Wolbachia

El género *Wolbachia* está constituido por bacterias gram-negativas, miembros de las rickettsiales y más concretamente de las α -proteobacterias. Dentro de este género de bacterias está *Wolbachia pipientis* (de aquí en adelante simplemente *Wolbachia*), un

microorganismo endosimbionte obligado de una enorme variedad de invertebrados, entre los que se encuentran los insectos, arácnidos, ácaros, crustáceos, y nematodos.

Su transmisión parece realizarse mayoritariamente por vía materna y se acepta que, según los grupos, entre un 25% y 75% de las especies de invertebrados, pueden estar infectadas (Hilgenboecker y col. 2008; Werren y col. 2008). El número de especies de insectos infectados por esta bacteria podría oscilar entre 10 y 30 millones, incluyendo varias especies de ortópteros (Werren y Windsor, 2000; Goodacre y col., 2006).

A nivel genómico se han podido diferenciar distintos tipos o cepas que se catalogan dentro de grandes supergrupos, entre los que, por abundancia, destacan el supergrupo A y B dentro de las cepas que infectan artrópodos (Werren, 1997) y el F por amplia variedad de hospedadores (Panaram y Marshall, 2007).

Las interacciones de esta bacteria con el huésped son complejas y variadas, van desde el mutualismo hasta el “parasitismo reproductivo”. Este último se presenta en muchas ocasiones y altera la reproducción de su huésped, facilitando la auto-transmisión de *Wolbachia* por diferentes vías (Cook y Butcher, 1999; Telschow y col., 2005a): inducción de partenogénesis, efecto feminizante, muerte selectiva de machos e incompatibilidad citoplasmática.

En el caso de la inducción de partenogénesis, las hembras infectadas son capaces de reproducirse asexualmente a partir de óvulos no fecundados, produciendo hembras como descendencia. Esto se suele dar en especies haplodiploides de huevos fecundados. En estas especies *Wolbachia* induce la generación de huevos diploides por duplicación gamética produciendo hembras sin ningún tipo de fecundación (Stouthamer y col., 1999; Kraaijeveld y col., 2009; Kremer y col., 2009; Cordaux y col., 2011).

Como resultado del efecto feminizante inducido por la bacteria, las hembras portadoras de *Wolbachia* producen una descendencia compuesta mayoritariamente por hembras. Los embriones infectados con dotación genética masculina se desarrollan como

hembras tanto a nivel morfológico como funcional. Este efecto se ha observado en Isópodos, Anfípodos y Lepidópteros infectados por la bacteria y se desconoce el mecanismo al que recurre la bacteria para llevarlo a cabo. Se pensaba que el proceso de feminización se completaba antes de las primeras fases de desarrollo embrionario, pero se ha visto que éste puede alargarse hasta las fases larvarias (Narita y col., 2007).

En la muerte selectiva de machos, producida por la infección por *Wolbachia*, una parte considerable de los embriones masculinos interrumpe su desarrollo y muere. Poco se sabe de este mecanismo, aunque todo apunta a que la bacteria produce un factor letal que sólo afecta a los machos (Hurst y Jiggins, 2000). Al igual que en el efecto feminizante, se ha observado que este proceso no se limita a las fases embrionarias del huésped (Charlat y col., 2007).

Por último, *Wolbachia* puede producir incompatibilidad citoplasmática (IC) (Yen y Barr, 1971) en su huésped. Ésta puede ser de dos tipos: unidireccional, los machos infectados producen descendencias normales únicamente cuando se aparean con hembras infectadas, o bidireccional si la infección del macho y la hembra tiene que ser por la misma cepa para que no se vea reducida la descendencia. En ambos casos los problemas reproductivos se asocian a la ausencia de fecundación o a la muerte de los embriones.

Este último es el efecto fenotípico más común que *Wolbachia* produce en su huésped y el que puede afectar de manera más notable a la dinámica de las poblaciones de un organismo. Pero aunque el mecanismo molecular que induce la IC por parte de la bacteria es desconocido, para explicar la IC se ha asumido de manera extendida el modelo mod/resc (de modificación y rescate) (Werren, 1997). Este modelo plantea que el esperma de un individuo infectado por *Wolbachia* sufre una modificación que implicaría la pérdida de su funcionalidad, que sólo podría verse recuperada si dicho espermatozoide fecundara un ovocito infectado. Es decir, si el macho está infectado y se cruza con una hembra no infectada, la descendencia se vería mermada.

Aunque, como se ha dicho anteriormente, el mecanismo molecular de este modelo es hasta ahora desconocido, sí parece que es multifactorial (Zabalou y col., 2008; Bossan y col., 2011), y sí se han constatado manifestaciones citológicas, como efecto de la infección, relacionadas con la IC. Por ejemplo se han observado defectos en la mitosis temprana de embriones como resultado de un desarrollo asincrónico de los pronúcleos femeninos y masculinos (Reed y Werren, 1995; Lassy y Karr, 1996; Tram y Sullivan, 2002). También se ha observado que en anafase, mientras los cromosomas maternos se separan normalmente, los paternos son excluidos, produciendo células haploides y embriones no viables (Tram y col., 2006).

La dinámica de la infección por *Wolbachia* en las poblaciones naturales varía según su cepa y la biología del hospedador (Reynolds y Hoffmann, 2002), además de que existen factores ambientales que pueden mermar su incidencia como la temperatura (Mouton y col., 2007) o la presencia de antibióticos naturales (Fenton y col., 2011) y artificiales (Hoffmann, 2005). Lo que parece estar ya bastante asumido, es que la distribución de esta bacteria es del nivel de una pandemia por su presencia global (Werren y col., 2008).

La importancia de *Wolbachia* dentro de la biología evolutiva, más que por su eficiente y extendida dispersión, es por su potencial para, mediante la IC, actuar como una barrera reproductiva (Coyne, 1992). La respuesta a la pregunta de si esta bacteria podría actuar como un agente evolutivo (Wade, 2001; Charlat y col., 2003) parece ser afirmativa, ya que puede suponer una importante barrera a la reproducción dentro de una población al separar en “su propio interés” dos grupos reproductivos (individuos infectados de los no infectados, o los individuos infectados por una cepa de los infectados por otra) y dando así la oportunidad de que actúen otros mecanismos de especiación (Telschow y col., 2005b) y de que se acumulen diferencias genéticas entre ambos subgrupos (Werren, 1998; Knight, 2001). Existen algunos indicios en este sentido (Bordenstein y col., 2001; Wade, 2001), si bien esta hipótesis es demasiado reciente y no ha sido todavía debidamente contrastada. De confirmarse, supondría el descubrimiento de una fuerza evolutiva, hasta ahora no considerada, cuya influencia en la historia de la vida estaría por determinar. No es descartable en absoluto que otros sistemas similares,

inducidos por otros parásitos “egoístas”, ocurran o hayan ocurrido en la evolución, sin excluir que se descubran modelos operativos equivalentes en organismos superiores (Hurst y Werren, 2001; Bordenstein, 2003).

Wolbachia y Chorthippus parallelus

Estudios recientes han puesto de manifiesto que las poblaciones de Cp presentan infección por *Wolbachia* (Dillon y col., 2008; Martínez y col., 2009; Bella y col., 2010; Zabala-Aguirre y col., 2010; Sarasa y col., 2012). Se han observado dos tipos de cepas diferentes, pertenecientes a los supergrupos B y F respectivamente, y frecuencias de infección por *Wolbachia* que varían según se trate de una población pura de Cpe, de Cpp o híbrida. En concreto, las poblaciones puras de Cpe presentan niveles de infección muy altos por el supergrupo F y las de Cpp se caracterizan por presentar un nivel bajo de infección por este supergrupo; aunque todas presentan en mayor o menor medida infección, e incluso en algunos casos aparecen numerosos individuos con coinfección (es decir, infectados por F y B). De hecho, este es un rasgo típico de alguna de las poblaciones de Cp de la zona de contacto de Portalet, donde la incidencia de la infección ha sido descrita recientemente (Zabal-Aguirre y col., 2010).

Pero no se sabe mucho de la variabilidad genética y del número de cepas de *Wolbachia* presentes dentro de cada supergrupo detectado, pues todos los datos se han obtenido a partir de secuencias del gen *16S rRNA* que se encuentra bastante conservado y, aunque muy útil para obtener una clasificación a nivel de supergrupo, es poco resolutivo como para la detección de cepas diferentes dentro de cada supergrupo. Existen diferentes genes que pueden usarse de manera complementaria, que no alternativa al *16S rRNA*, que pueden ayudar a la hora de obtener una mayor información de la realidad de la infección. Algunos de estos genes son el *wsp*, el *groEL* y el *gltA* que codifican para una proteína de superficie, la proteína de choque térmico 60 y la enzima citrato sintetasa respectivamente. Estos genes han sido ampliamente utilizados para clasificar cepas de

Wolbachia y estudiar su diversidad (Zhou y col., 1998; Bordenstein y Rosengaus, 2005; Ros y col., 2009) pero no hay un criterio extendido de cuales son más informativos y en cada estudio se usan distintos genes. Esto impide, en muchas ocasiones, comparar los resultados obtenidos en ellos. Recientemente se ha diseñado un método optimizado para la identificación de cepas de *Wolbachia* basado en un sistema multilocus (MLST) con 5 genes que permite una aproximación más fina y que permitiría comparar los resultados obtenidos entre diferentes trabajos (Baldo y col., 2006). Esta técnica usa los genes *gatB*, *hcpA*, *ftsZ*, *fbpA* y *coxA* (tabla 1) seleccionados por tres características: son típicos de las bacterias pertenecientes al orden de los rickettsiales, se encuentran en copia única y distribuidos a lo largo del genoma de wMel (Wu y col., 2004) y se han detectado evidencias de que estos genes están bajo fuerte selección estabilizadora dentro del género *Wolbachia*, es decir, estos genes presentan un relación media entre el número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo (K_a) y el número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo (K_s) muy inferior a uno ($K_a/K_s \ll 1$). Este criterio ha sido seleccionado conforme a los requerimientos estándar para un locus que forma parte de un sistema MLST (Urwin y Maiden, 2003).

El uso de este sistema permite, por un lado, clasificar las cepas presentes dentro de un supergrupo y, por otro, analizar posibles eventos de recombinación, tanto dentro de un gen como entre diferentes genes. Además, según el diseño experimental, con las secuencias obtenidas se puede inferir el origen de la infección y hacer estudios de filogeografía.

Tabla 1: Genes del sistema MLST y su función.

Gen	Función	Referencia
<i>gatB</i>	Subunidad B de la glutamil-tRNA	Nobelmann y Lengeler, 1996
<i>hcpA</i>	Proteína hipotéticamente conservada	Cao y col., 1998
<i>ftsZ</i>	Proteína de la división celular	Begg y Donachie, 1985
<i>fbpA</i>	Fijación de CO ₂	Gibson y Tabita, 1988
<i>coxA</i>	Subunidad I de la citocromo-c oxidasa	O'Brian y Maier, 1987

Por otra parte, la presencia de *Wolbachia* en la zona híbrida de Cp (Zabal-Aguirre y col., 2010) la sitúa como un nuevo agente a valorar, sobre todo teniendo en cuenta la IC detectada que produce en dicho huésped. Se ha observado que los cruzamientos que implican una IC bidireccional tienen una reducción del 16% en la producción de embriones, incrementándose hasta el 32% en el caso de los cruzamientos con IC unidireccional (Bella y col., 2010). Esto, además de dar protagonismo a esta bacteria en el contexto de la zona híbrida de Cp, invita a plantearse cuestiones alrededor de los efectos que este endosimbionte pueda tener en la reproducción de dicho organismo.

Como ya se ha comentado anteriormente, se sabe poco de los mecanismos moleculares que subyacen en la IC, pero se han detectado efectos de *Wolbachia* en su huésped que han sugerido la teoría de la modificación y rescate (mod/resc) (Werren, 1997; Presgraves, 2000; Charlat y col., 2001) que implica modificaciones en las células germinales. Por esto, nos preguntamos si esta bacteria puede estar relacionada con la malformación de espermatidas en Cp, pues en otros organismos se han visto efectos negativos en la maduración de dichas células (Riparbelli y col., 2012). También nos planteamos si el número de quiasmas producidos durante la meiosis podría verse afectado por la infección como resultado de la modificación en la estructura de la cromatina que bajo el modelo mod/resc se espera que produzca la bacteria en los gametos de su huésped. O, también, como consecuencia de la posible inserción parcial del genoma bacteriano en los cromosomas de los individuos infectados de Cp (Sarasa, 2009) ya que se han detectado, en diferentes casos, transferencia genética del genoma de la *Wolbachia* al de su huésped (Kondo y col., 2002; Fenn y col., 2006; Hotopp y col., 2007; Nikoh y col., 2008; Klasson y col., 2009). Por último, nos planteamos si puede existir algún vínculo entre el patrón de bandas heterocromáticas y la presencia de un NOR en el cromosoma X de Cp y el tipo de infección por *Wolbachia* como indicador de la existencia de un citotipo más sensible a la infección, pues se ha observado que la banda P puede estar sujeta a procesos de selección (Serrano y col., 1996). De esta manera, no es objetivo de este trabajo dilucidar los caminos moleculares de la IC, pero sí rastrear qué efectos puede tener la infección de *Wolbachia* en *Chorthippus parallelus* a un nivel citogenético.

OBJETIVOS

Las poblaciones del puerto Viejo de Sallent son un paso alternativo al de Portalet en la zona de contacto de *Chorthippus parallelus parallelus* y *Chorthippus parallelus erythropus*. Estas poblaciones prácticamente no han sido estudiadas y podrían aportar datos interesantes para el análisis de la zona híbrida de este organismo en los Pirineos. No hay datos de ellas ni para las bandas heterocromáticas del cromosoma X, ni para la infección por *Wolbachia pipientis*, un nuevo agente que parece jugar un papel importante en la zona híbrida y en la biología de *Chorthippus parallelus*. Estos resultados se podrían comparar con los obtenidos en estudios previos en el mismo transecto que atraviesa Portalet. Además, análisis complementarios utilizando nuevos marcadores genéticos pueden aportar nuevas perspectivas de la situación de las poblaciones y su dinámica en la zona híbrida. Así pues, el objetivo principal de este trabajo es profundizar en el conocimiento de la estructura y dinámica de las poblaciones de *Chorthippus parallelus* en su zona híbrida de Pirineos y el posible efecto de *Wolbachia pipientis* en ellas. Para abordar este objetivo general, nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

- Caracterizar citogenéticamente los individuos de 5 poblaciones muestreadas en el puerto Viejo de Sallent.
- Establecer a partir de estos marcadores un transecto a lo largo del puerto Viejo de Sallent y compararlo con el de Portalet.
- Explorar el uso de microsatélites descritos en individuos de *Chorthippus parallelus* de poblaciones alemanas, en individuos de poblaciones de la zona híbrida de Pirineos.
- Caracterizar con dichos marcadores genéticos (microsatélites) las poblaciones de la zona de contacto del valle de Tena y de Ossau a través del puerto Viejo de Sallent.
- Contrastar si las poblaciones asignadas por criterios geográficos están a su vez genéticamente estructuradas para los marcadores utilizados en este trabajo.

- Caracterizar los supergrupos a los que pertenece la infección por *Wolbachia pipientis* en estas poblaciones.
- Profundizar en la naturaleza de la infección y su número de cepas.
- Analizar si existe alguna asociación entre el tipo de infección por *Wolbachia pipientis* y ciertos marcadores citogenéticos del cromosoma X.
- Estudiar si la infección puede afectar a la frecuencia de quiasmas de *Chorthippus parallelus*.
- Valorar el efecto de la infección en la espermatogénesis de *Chorthippus parallelus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreos

Para el muestreo de las poblaciones se diseñó un transecto que une el valle de Tena (España) con el valle de Ossau (Francia) pasando por el puerto viejo de Sallent de Gállego (figura 5). En este transecto se muestrearon las siguientes poblaciones: Escarrilla, Sallent de Gállego, Corral de Mulas, Puerto Viejo 1, Puerto Viejo 2, Puerto Viejo 3, Puerto Viejo 4, Puerto Viejo 5, Portalet, Cabaña Antigua, Tourmont, Soques, L'Hermine, Gabas y Arudy. Todas las muestras se recogieron durante el verano de 2009 en el Pirineo Central a excepción de una muestra de machos recogida en Portalet en 2005. Además se recolectaron muestras de una población externa a la zona híbrida, en Sierra Nevada, Andalucía (España) en el verano del 2010 como población control, pues se encuentra geográficamente aislada del resto de las poblaciones de la península. Además es la población más meridional, así que también puede aportar información del origen de la infección por *Wolbachia*. Los detalles sobre el número, taxón y sexo de los individuos muestreados se presentan en la tabla 2. En total se recogieron 1123 individuos de 16 poblaciones.

Una vez capturados los individuos, en el mismo lugar de muestreo se extraen las gónadas. En las hembras se conservan en etanol absoluto y en los machos, según poblaciones, si el tamaño de la gónada lo permite se corta en dos y se fija una mitad en etanol-ácido acético glacial purísimo 3:1 y la otra mitad en etanol absoluto. Si esto no es posible por el tamaño de la gónada es el cuerpo el que se conserva en etanol absoluto (tabla 2). En todos los casos el material se mantiene refrigerado hasta su estudio. Aunque se muestrearon individuos de ambos sexos, el análisis citogenético se ha realizado únicamente en la meiosis masculina, pues es mucho más sencillo obtener preparaciones cromosómicas a partir de los machos, además de la facilidad para identificar el cromosoma X por su condición de univalente en este sexo. En las hembras

sólo se podría hacer el análisis citogenético a partir de cromosomas mitóticos, pues en preparaciones cromosómicas hechas con las gónadas femeninas es difícil identificar cromosomas y bandearlos, pues éstos se encuentran en un estado difuso y no están bien individualizados.

Figura 5 (derecha). Distribución de las poblaciones estudiadas de la zona híbrida de *Chorthippus parallelus* en el Pirineo Central entre el valle de Tena (España) y el valle de Ossau (Francia). En amarillo poblaciones de *Chorthippus parallelus erythropus*, en verde de *Chorthippus parallelus parallelus* y en rojo poblaciones híbridas. Las líneas de puntos indican los transectos analizados: en azul el que transcurre por Portalet y en amarillo el tramo del puerto Viejo de Sallent. En negro cotas superiores a los 2000 metros.

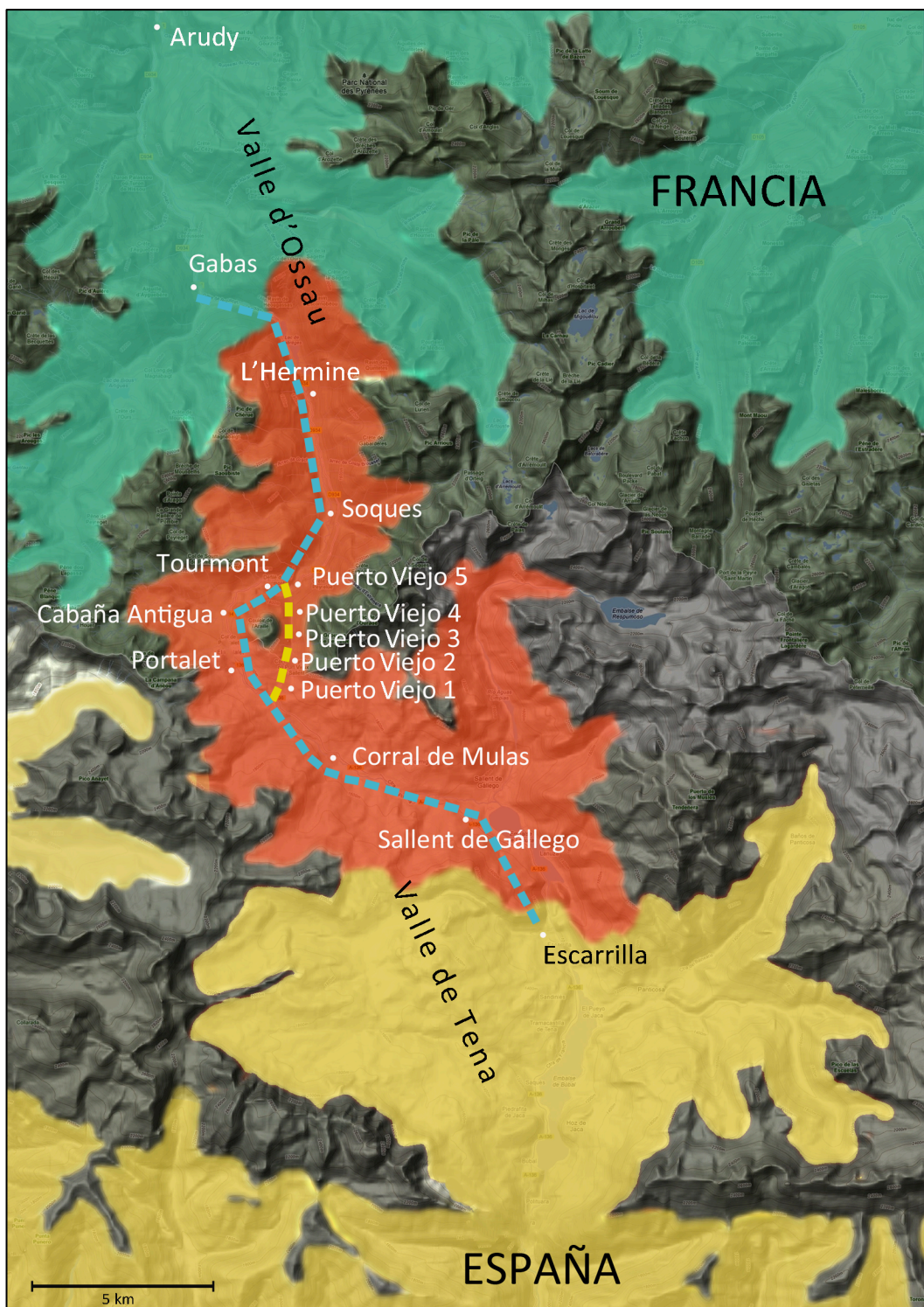


Tabla 2. Poblaciones estudiadas. Cpe y Cpp: poblaciones puras de *Chorthippus parallelus erythropus* y *Chorthippus parallelus parallelus*, respectivamente. Híbrido: poblaciones híbridas entre *Chorthippus parallelus erythropus* y *Chorthippus parallelus parallelus*. N; tamaño muestral. Poblaciones totales estudiadas 16. Individuos muestreados 1123, de los cuales 627 son machos y 496 hembras.

Población	Taxón	Coordenadas	N	Fijación
Sierra Nevada	Cpe	36° 58' 27,97"N 3° 21' 15,62"O	13 ♀ 13 ♂	Etanol
Escarrilla	Cpe	42°43'58,18"N 0°18'46,53"O	57 ♀ 31 ♂	Etanol
Sallent de Gállego	Cpe	42°45'56,61"N 0°20'28,89"O	28 ♀ 23 ♂	Etanol
Corral de Mulas	Híbrido	42°47'09,4"N 0°23'34,4"O	31 ♀ 28 ♂	Etanol
Puerto Viejo 1	Híbrido	42°47'43,28"N 0°24'12,89"O	37 ♀ 29 ♂	Etanol Etanol-Ácido Acético (3:1)
Puerto Viejo 2	Híbrido	42°47'58,98"N 0°23'54,45"O	35 ♀ 26 ♂	Etanol Etanol-Ácido Acético (3:1)
Puerto Viejo 3	Híbrido	42°48'20,67"N 0°23'49,97"O	21 ♀ 34 ♂	Etanol Etanol-Ácido Acético (3:1)
Puerto Viejo 4	Híbrido	42°48'50,34"N 0°23'52,92"O	35 ♀ 19 ♂	Etanol Etanol-Ácido Acético (3:1)
Puerto Viejo 5	Híbrido	42°49'10,31"N 0°23'48,00"O	28 ♀ 26 ♂	Etanol Etanol-Ácido Acético (3:1)
Portalet	Híbrido	42°48'03"N 0°24'54"O	49 ♀ 103 + 67 ♂	Etanol Etanol-Ácido Acético (3:1)
Cabaña Antigua	Híbrido	42°48'51,1"N 0°25'05,5"O	25 ♀ 26 ♂	Etanol
Tourmont	Híbrido	42°49'11"N 0°24'21"O	25 ♀ 39 ♂	Etanol
Soques	Híbrido	42°50'07,4"N 0°23'02,9"O	29 ♀ 35 ♂	Etanol
L'Hermine	Híbrido	42°51'46,8"N 0°23'30,4"O	27 ♀ 28 ♂	Etanol
Gabas	Cpp	42°53'40,05"N 0°25'48,56"O	36 ♀ 26 ♂	Etanol
Arudy	Cpp	43°7'0"N 0°25'60"O	48 ♀ 46 ♂	Etanol

Obtención de preparaciones cromosómicas

A partir de los folículos de las gónadas fijadas de los machos según se ha indicado anteriormente. Las preparaciones se realizan por aplastado del material en ácido acético al 45%, posteriormente se sumergen en nitrógeno líquido, se retira el cubreobjetos y se dejan secar hasta su procesamiento posterior.

Bandeado-C

Esta técnica pone de manifiesto la presencia y localización de la heterocromatina constitutiva en los cromosomas (Sumner, 1972). La metodología utilizada está descrita por López-Fernández y Gosálvez (1981). El tratamiento consiste en incubar las preparaciones durante 30 min a 60 °C en una solución saturada de hidróxido de bario (al 5% en agua corriente), lavar las preparaciones con abundante agua y dejarlas 5 min sumergidas en agua con unas gotas de ácido acético. Se vuelven a lavar las muestras y se incuban durante 30 min a 60 °C en una solución salina de citrato doblemente concentrada (2xSSC: cloruro sódico 0,15 M, citrato sódico 0,015 M pH 6,8-7), finalmente, se lavan las preparaciones y se dejan secar. Las muestras se observan teñidas con Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemania) (al 2% con agua corriente) en un microscopio óptico.

La aplicación de esta técnica permite estudiar el patrón de bandas-C que presenta cada individuo en su complemento cromosómico y, por tanto, en su cromosoma X. Esto es materia principal de nuestro estudio, por tratarse de un marcador citogenético característico de la zona híbrida (Gosálvez y col., 1988; Serrano, 1994; Serrano y col., 1996).

Frecuencia de quiasmas

El número de quiasmas se contabilizó en preparaciones realizadas mediante la técnica estándar de aplastado con orceína acética (La Cour, 1941). Para ello se aplastaron folículos testiculares en una gota de orceína acética al 2% mediante la técnica habitual de *squash*. Éstos se observaron con un microscopio óptico (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania y Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). La frecuencia de quiasmas se contabilizó en 10 células por individuo en diplotene tardía y diacinesis temprana, pues es en estas fases de la meiosis donde los quiasmas se distinguen mejor.

Morfología de las espermátidas

Para analizar la morfología de las espermátidas se realizaron preparaciones como las descritas en el párrafo anterior y se contabilizaron 1500 células por individuo, clasificando las espermátidas según su morfología como normales y anormales según su forma (estándar o amorfo) y según su tamaño (micro- y macroespermátidas). A partir de estas medidas se calculó el porcentaje de espermátidas anómalas o índice de anormalidad (IA).

Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) de ADN ribosómico

La presencia en el cromosoma X de NORs detectadas mediante tinción argéntica y FISH de secuencias de ADNr es una característica diferencial entre las subespecies de *Chorthippus parallelus*, pues mientras Cpp presenta estas secuencias en los autosomas L1 y L2 y en su cromosoma sexual, Cpe solo las presenta en los autosomas. Así pues, con objeto de corroborar estos resultados y explorar la presencia de otras regiones de ADNr que no transcriban en el complemento cromosómico de las subespecies de Cp en

estudio, se ha realizado una FISH con una sonda específica. Para ello se usa una secuencia del ITS1 la cual se encuentra muy conservada (Schlotterer y col., 1994) y forma parte de las NORs en los eucariotas.

Para la obtención de la sonda se realiza una amplificación de una región de 602 pb del ITS1 de Cp (Parkin y Butlin, 2004) usando como molde ADN genómico de Cp y los *primers* ITS1a (5'-CCT TTG TAC ACA CCG CCC GT) e ITS1d (5'-GTT CAT GTG TCC TGC AGT TCA C) (Sharpe y col., 2000). El protocolo de amplificación es una PCR convencional en la que se añade un nucleótido conjugado con digoxigenina. De esta manera la mezcla de reacción consta de 100 ng de ADN, MgCl₂ 2mM, dATP, dCTP y dGTP 0,2 mM, dTTP 0,14 mM, dUTP-digoxigenina 0,06 mM (Roche, Basel, Suiza), 10 pmoles de cada *primer* y 1 U de Taq polimerasa y 1x de su tampón comercial (Biotools, B&M Labs, Madrid, España), todo en un volumen final de 25 µL. El programa de PCR usado, con una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, es de 35 ciclos donde cada ciclo tiene 1 min a 94°C, 1 min a 67°C y 1,5 min a 72°C, con un tiempo final de elongación de 15 min a 72°C.

Del producto de esta reacción se usan 5 µL para ver el resultado en un gel de agarosa (Pronadisa, Madrid, España) al 1% en TAE (Tris-acetato 40 mM, pH 7.6, EDTA 2mM). Los otros 20 µL se precipitan con 2,5 µL de LiCl 4 M y 75 µL de etanol absoluto durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente la sonda se lava con etanol al 70% y se deja secar. Una vez seca se resuspende en mezcla de hibridación (formamida 50% v/v, sulfato de dextrano 10% p/v y 2XSSC) dejando la sonda a una concentración final de 20 ng/µL.

Para realizar la hibridación se hace una preparación en un portaobjetos estándar mediante aplastado de uno o dos folículos testiculares, según se ha descrito anteriormente. A continuación se deshidrata la preparación pasándola durante 2 min por sucesivos etanoles al 70, 85 y 100%. Se desnaturaliza en formamida al 70% / 2xSSC. Se vuelve a pasar por la misma serie de etanoles y se le añaden 10 µl de sonda previamente desnaturalizada en un baño a 70°C durante 10 min. Se deja hibridando durante toda la noche en una cámara húmeda a 37°C. Al día siguiente se lava la preparación a 43°C en formamida al 50% / 2xSSC durante 15 min y después en 2xSSC a

37°C durante 8 min. Posteriormente se añade a la preparación un bloqueante de anticuerpos inespecíficos (BSA 10% p/v, Tween 20 20% v/v y 2xSSC) y se incuba durante 5 min a 37°C en cámara húmeda. Por último se revela la hibridación con FITC/Anti-digoxigenina a 8 µg/mL (Roche, Basel, Suiza). Para ello se incuba la preparación durante 25 min a 37°C en una cámara húmeda. Finalmente se contratiñe con DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato, Roche, Basel, Suiza) a una concentración de 2 µg/mL y se le añade un *anti-fading* (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, California, Estados Unidos). Se analizan las muestras con un microscopio de fluorescencia Leica DMRB y las fotos se tomaron con una cámara digital Leica DFC 350 FX (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Impregnación argéntica

La tinción con nitrato de plata es un método simple y rápido para estudiar, desde un punto de vista citológico, la expresión del ADNr (NORs), dada su capacidad para revelar los productos de transcripción de dichas zonas (Miller y col., 1976). Entre las distintas técnicas descritas se ha utilizado la desarrollada por Rufas y Gosálvez en 1982, cuyo procedimiento se describe a continuación.

Sobre el material, previamente fijado en el portaobjetos, se coloca una gota de una solución de nitrato de plata (AgNO_3 al 50% en agua corriente acidificada con una gota de ácido fórmico). El propio peso del cubreobjetos extiende la gota sobre el material. Se incuban las preparaciones, en cámara húmeda a 60°C, durante aproximadamente 5 min. Una vez que se observa el grado de tinción apropiado se quita el cubreobjetos, se lavan las muestras con abundante agua corriente y se dejan secar. Para observar las preparaciones se pueden contrateñir con Giemsa al 2%.

Extracción de ADN

Se dejan secar las gónadas y cuerpos sobre papel de filtro, una vez que el fijador está totalmente evaporado, se introduce cada muestra en un tubo *ependorf* de 2 mL en el que previamente se han introducido de 5 a 10 bolas de cristal de diferentes tamaños. Este material se congela en nitrógeno líquido para a continuación, homogeneizarlo en un molino Retsch MM 400 (Retsch GmbH, Hann, Alemania) con una frecuencia de 30 golpes por segundo y durante 90 segundos. Este paso se realiza dos veces. En este punto, en el que el material se encuentra pulverizado y congelado, se procede a la extracción del ADN genómico según se indica a continuación, si bien las muestras se pueden guardar a -80°C.

Para lisar las células y obtener el ADN se añade a cada tubo 580 µL de tampón de extracción, TNES (Tris-HCl 50 mM pH 8,25, NaCl 50 mM, EDTA 50 mM, SDS 1%) y 20 µL de proteinasa K a 20 mg/mL (Roche, Basel, Suiza). Se incuban las muestras toda la noche a 37°C.

Al día siguiente se extraen los ácidos nucleicos mediante fenoles. Para ello se añade a la muestra con el tampón de extracción 1 volumen de fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1) y se mezcla todo por inversión durante 2 min. Se centrifuga a 8000 rpm y se recupera el sobrenadante que, en un tubo *ependorf* nuevo de 1,5 mL, se mezcla con 1 volumen de cloroformo-álcool isoamílico (24:1). Esto se mezcla igualmente por inversión y se centrifuga de la misma manera. Se recupera la fase acuosa (sobrenadante) y se precipita con 2 volúmenes de etanol absoluto durante toda la noche a -20°C o durante 1 hora a -80°C.

Para recuperar los ácidos nucleicos precipitados se centrifugan los tubos a máxima velocidad (mínimo 10.000 rpm) durante 10 min, se desecha la parte líquida teniendo cuidado de no perder el *pellet*. Éste se lava con 100 µL de etanol al 70% y se vuelve a centrifugar a la misma velocidad durante 5 min. Se retira el etanol y se deja secar completamente el *pellet*. Finalmente, éste se resuspende en 200 µL de TE (Tris-HCl 10

mM, pH 8,0 y EDTA 1 mM) con 2 μ L de RNAsa H (0,05% p/v) (Roche, Basel, Suiza) y se incubaba 1 hora a 37°C. La concentración final de ADN se mide con un NanoDrop (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, Delaware, EEUU) y se realizan diluciones en agua destilada estéril a una concentración final de 20 ng/ μ L.

Amplificación de secuencias cortas repetidas (microsatélites) de *Chorthippus parallelus*

Se han genotipado 20 individuos, 10 machos y 10 hembras de las poblaciones de Escarrilla (Cpe), Puerto Viejo 1, Puerto Viejo 3 y Puerto Viejo 5 (híbridos) y Gabas (Cpp). En total 100 individuos. Para ello se han usado 9 microsatélites de *Chorthippus parallelus* descritos por Pfautsch y colaboradores (Abercrombie y col., 2009), mediante las siguientes 9 parejas de *primers* (*forward* y *reverse*): Cpara_B-H5, Cpara_B-F1, Cpara_C-D6, Cpara_B-H12, Cpara_II_B-F9, Cpara_II_B-D2, Cpara_II_B-G5, Cpara_B-D7 y Cpara_B-D5 descritos en la tabla 3 (a partir de ahora se hará referencia a ellos según la abreviatura descrita en dicha tabla). Uno de los *primers* de cada pareja debe estar marcado con un fluorocromo en el extremo 5'. Esto permite, por electroforesis capilar, la lectura de los fragmentos amplificados. Este procedimiento se detallará más adelante.

La mezcla de reacción para la amplificación de estas secuencias se lleva a cabo en un volumen final de 20 μ L que contiene 20 ng de ADN, 1 pmol de cada *primer*, BioMix Red 1x (BioLine inc., Taunton, Massachusetts, EEUU) y agua Milli-Q. El programa a usar es de tipo *stepdown* PCR (Hecker y Roux, 1996), denominado así por comenzar con unos ciclos con una temperatura de anillamiento muy alta que después va decreciendo en los sucesivos ciclos. De esta manera el termociclador se programa de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min. A continuación 40 ciclos con tres pasos de 1 min a 94°C, 1,5 min a 64°C (desde el ciclo 1 al 5, para pasar a 60°C del ciclo 6 al 10,

después a 56°C del 11 al 20 y finalmente a 50°C los últimos 20 ciclos) y 1,5 min a 72°C. Finalmente se programan 15 min a 72°C.

Tabla 3. *Primers* utilizados para la amplificación de secuencias microsatélites de *Chorthippus parallelus* (Abercrombie y col., 2009). Cada set se compone de cuatro marcadores que pueden analizarse simultáneamente en la misma electroforesis capilar, pues se diferencian por tamaño y color.

Primer (Abreviatura)	Secuencia	Fluorocromo Color emisión	Secuencia repetida	Referencia GenBank¹	Set
Cpara_B-H5 (H5)	5'ACATTTACAAAGAGCCGAACA3' 5'TCAGCCTTTTCTCGACTCTA3'	6-FAM TM azul	(GTAA)n	FJ938197	1
Cpara_B-F1 (F1)	5'TGCGCCTATCCTTTTGCTTA3' 5'ATGAAGGCTGTGGCTGAAAG3'	VIC® verde	(AC)n	FJ938199	
Cpara_C-D6 (D6)	5'TGCCAACTGATATCTTCTGTAATTA3' 5'CAGCCATTGTTATAGGTTACTCTTT3'	NED amarillo	(TC)n	FJ938198	
Cpara_B-H12 (H12)	5'TACTGTATTTATTTTGCAAGAA3' 5'TTGCCTTCTTAATTGTAT3'	PET TM rojo	(TGC)n (TAC)n	FJ938200	
Cpara_II_B-F9 (F9)	5'CGGCATCGCGCGAAAAAGCAC3' 5'TGAAACCAGCGCGGACAACTTGC3'	6-FAM TM azul	(AC)nATAC ATTCAT(AC)n AT(AC)n	FJ938203	2
Cpara_II_B-D2 (D2)	5'CTCTAGCCTGTCTCCATTCA3' 5'CGACCCAAGCGTAAGTGTAAG3'	VIC® verde	(TTACAC)n TTACGC	FJ938204	
Cpara_II_B-G5 (G5)	5'TCTGTTTTCTGATGCAATTTAA3' 5'TGTTAATAGTCCTCAAGTGCAT3'	NED TM amarillo	(GT)n(GA)nCA (GA)n(TAGA)n CAGA(TAGA) (GA)nGG(GAn	FJ938205	
Cpara_B-D7 (D7)	5'CCCTATATGTCACAGTCTCGGCA3' 5'GATTACCGCATTGACAACGACT3'	PET TM rojo	(ACACT)n ACAA(AC)n AA(AC)n	FJ938202	
Cpara_B-D5 (D5)	5'TCATGTTTCAGATTCCGTT3' 5'ATTCAATTTAAGATGCCAC3'	*	(AC)n	FJ938201	

¹<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> *Estos *primers* se probaron pero fueron descartados.

Se ha probado igualmente a amplificar varios microsatélites de un individuo en la misma mezcla de reacción, realizando lo que se llama una PCR *multiplex*. Este procedimiento se lleva a cabo igual que la PCR descrita en el párrafo anterior, con una única diferencia, en la mezcla de reacción se incluyen en vez de una pareja de *primers* tantas parejas como marcadores se quieran amplificar, en este caso cuatro. Esto reduce considerablemente el número de reacciones de PCR, lo que implica, por tanto una reducción del coste.

Para verificar si se ha producido amplificación y estimar su rendimiento (de forma cualitativa) se prepara un gel de agarosa en TAE al 2% p/v. Después de comprobar mediante un gel de agarosa que la amplificación ha sido eficiente, las muestras se procesan mediante electroforesis capilar en un secuenciador (ABI Prism 3700, Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU). El usado en este trabajo permite la lectura de hasta cinco fluorocromos distintos, uno de ellos reservado para el estándar o marcador de tamaño. Se probaron nueve parejas de *primers*, pero una de ellas no amplificaba en una de las subespecies (ver resultados), por lo tanto finalmente se trabajó con ocho marcadores. Los ocho marcadores amplificados individualmente a partir de una sola muestra se podían leer en dos electroforesis mediante la combinación de cuatro fluorocromos distintos en dos sets (tabla 3).

Las muestras amplificadas no necesitan ningún tratamiento especial para su lectura en la electroforesis capilar. Solo es necesario realizar una dilución de cada uno de los productos de PCR, en función de la intensidad de amplificación que se detecte en el gel y así se evita que una señal excesivamente fuerte de uno de los fluorocromos sature los canales de detección del resto de ellos. Una vez hechas las diluciones se coge el mismo volumen de cada uno de los amplificados, 2 µL de cada. En este trabajo, siempre se realizó la lectura de los marcadores del mismo modo, por un lado el H5, F1, D6 y H12 (set 1), en proporción 1:2:1:4 y por otro lado el F9, D2, G5 y el D7 (set 2) en proporción 1:2:1:1. A continuación se coge 0,5 µL de la mezcla de los amplificados, se le añade a cada muestra 0,25 µL de marcador de tamaño LIZ® 500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), 9,5 µL de formamida (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU) y se realiza la lectura de los fragmentos en un secuenciador ABI Prism

3700 (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU), todo esto según las directrices del fabricante. Los datos generados a partir de esta lectura se analizan y asignan a genotipos con el programa informático GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU).

Amplificación de secuencias de *Wolbachia*

Con el fin de detectar si las poblaciones de *Chorthippus parallelus* estudiadas presentan infección por *Wolbachia*, determinar su cepa (supergrupo), estudiar su incidencia en la población y realizar una filogeografía de la infección, se han amplificado fragmentos de los siguientes genes de esta bacteria: *16S rRNA*, *wsp*, *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ* y *fbpA* (Baldo y col., 2006).

El gen *16S rRNA* se amplifica en dos pasos, se realiza primero una PCR general con unos *primers* especie-específicos, y a continuación una *nested* PCR con unos *primers* exclusivos para los supergrupos B y F de *Wolbachia*. Las condiciones de reacción son iguales, exceptuando que la primera PCR contiene como molde 100 ng de ADN genómico y la segunda 0,5 µL del producto obtenido en la primera PCR. El resto de reactivos que contiene la mezcla de reacción son: MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0,2 mM (de cada uno), 30 pmoles de cada *primer* (tabla 4) y 1,25 U de Taq polimerasa (Biotools, Madrid, España), en un volumen final de 25 µL. El programa de PCR para la amplificación general consta de 30 ciclos (95°C durante 30 s, 54°C durante 1 min y 72°C durante 2 min) y el de la "nested" de 40 ciclos (95°C durante 30 s, 68°C durante 1 min y 72°C durante 1 min) ambas con una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C y una elongación final de 15 min a 72°C.

Cada uno de los fragmentos de los genes *wsp*, *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ* y *fbpA* se amplifican en una mezcla de reacción que tiene 100 ng de ADN, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0,2 mM (de cada uno), 30 pmoles de cada *primer* (tabla 4) y 1,25 U de Taq polimerasa

(Biotoools, Madrid, España), todo en un volumen final de 50 µL. El programa de PCR es de 35 ciclos, cada uno de ellos consta de los siguientes pasos: 94°C durante 30 s, 54°C durante 45 s y 72°C durante 1 min (excepto para el *wsp* y el *fbpA*, cuya temperatura de anillamiento es de 59°C).

Finalmente se observa el resultado mediante electroforesis en un gel de agarosa (Pronadisa, Madrid, España) al 1% p/v con bromuro de etidio (0.00005% p/v) visualizándolo con un transiluminador de luz ultravioleta.

Tabla 4. Secuencias de los *primers* usados para amplificar fragmentos de los loci de *Wolbachia gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ fbpA*, *wsp* y *16S rRNA*.

Primer	Secuencia	Tamaño pb	Referencia
<i>gatB</i>	5'GAKTTAAAYCGYGCAGGBGTT3' 5'TGGYAAAYTCRGGYAAAGATGA3'	470	Baldo y col., 2006
<i>coxA</i>	5'TTGGRGCRATYAACTTTATAG3' 5'CTAAAGACTTTKACRCCAGT3'	490	"
<i>hcpA</i>	5'GAAATARCAGTTGCTGCAAA3' 5'GAAAGTYRAGCAAGYTCTG3'	515	"
<i>ftsZ</i>	5'ATYATGGARCATATAAARGATAG3' 5'TCRAGYAATGGATTGATAT3'	525	"
<i>fbpA</i>	5'GCTGCTCCRCTTGGYWTGAT3' 5'CCRCCAGARAAAAYACTATTC3'	510	"
<i>wsp</i>	5'GTCCAATARSTGATGARGAAAC3' 5'CYGCACCAAYAGYRCTRATAA3'	600	"
<i>16S general</i>	5'ACTGCTACCTTGTTACGACTT3' 5'TTGTAGCTTGCTATGGTATAACT3'	1400	Zabal-Aguirre y col., 2010
<i>16S_B</i>	5'GCCTATATTAGATTAGCTAGTTGGTGGA3' 5'TATCCCTTCGAATAGGTATGATTT3'	850	"
<i>16S_F</i>	5'TGAGCCTATATTAGATTAGCTAGTTGGTAAG3' 5'TATCCCTTCGAATAGGTATGATTT3'	850	"

Secuenciación de productos de PCR

Aquellos productos de amplificación que se quieran secuenciar han de ser primero purificados. Para ello se utiliza el kit *GFX PCR DNA Purification* de Amersham Biosciences (Friburgo, Alemania), si el producto de PCR es aislado desde un gel de agarosa o, el kit ExoSap-IT (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) si lo que se quiere es tratar directamente la reacción de la PCR. Se usa este segundo método siempre y cuando el producto de PCR cargado en un gel de agarosa se muestre como una banda clara y única.

La secuenciación directa de ADN de fragmentos de amplificación de PCR se realiza mediante el kit ABI BigDye v3.1 y el secuenciador de ADN automatizado ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU).

Análisis de microsatélites

Los genotipos obtenidos para cada individuo se han utilizado para calcular diferentes estimadores. Con el programa Microsatellite-Analyzer (MSA) (Dieringer y Schlötterer, 2003) se ha calculado la riqueza alélica, el número de alelos por locus y en cada locus, la heterocigosidad observada y esperada por locus y población, así como si las diferencias entre ellas eran significativas. También se han estimado dos estadísticos de F (Wright, 1949), el F_{st} o índice de fijación que mide la diferenciación genética entre poblaciones y el F_{is} o coeficiente de endogamia que valora los niveles de consanguinidad de las poblaciones en su conjunto. Para evaluar el equilibrio Hardy-Weinberg, el de ligamiento y las F_{st} entre poblaciones se ha usado el software GENEPOP'007 (François, 2008). Con la herramienta informática FreeNA se ha valorado el efecto de los alelos nulos y calculado unas F_{st} corregidas mediante el método de ENA (Chapuis y Estoup, 2007). Como la presencia de alelos nulos es uno de los problemas del uso de microsatélites, se ha hecho también un análisis con el Micro-Checker (Van Oosterhout y col., 2004) que

permite estimar la presencia de estos. Por último, mediante el programa informático STRUCTURE (Evanno y col., 2005), se agrupó los individuos en diferente número de poblaciones, para investigar la estructura de las muestras.

Análisis de secuencias de *Wolbachia*

Las secuencias han sido editadas y los alineamientos realizados y revisados mediante el programa ClustalX 2.0 (Larkin y col., 2007) con el software BioEdit versión 7.0.9.0 (Hall, 1999) y ProSeq versión 3.0 (Filatov, 2009). Para corroborar la homología de las secuencias obtenidas con los genes esperados se ha realizado, en la base de datos GenBank (Benson y col., 2011) un análisis con la herramienta en red BLAST para secuencias altamente similares (*megablast*) (Johnson y col., 2008). Para las secuencias de los genes *16S rRNA* y *wsp*, una vez confirmado que eran correctas, se ha seleccionado, entre las secuencias obtenidas mediante BLAST, algunas que se hubieran usado para identificar la infección de *Wolbachia* en otros trabajos cuyos resultados estuvieran bien contrastados en la literatura (tabla 5). Para el caso de los genes usados en el sistema multilocus se han utilizado secuencias de la base de datos *Wolbachia* MLST (<http://pubmlst.org/wolbachia/>, Jolley y col., 2004) (tabla 6). En esta base de datos es fácil encontrar las secuencias de los 5 genes que componen el sistema multilocus para una misma cepa de *Wolbachia*, pues surgió con este cometido, mientras que en el GenBank este proceso es bastante más arduo, de hecho, en muchas ocasiones es difícil identificar si las secuencias de dos loci ha sido obtenidas a partir del mismo organismo.

La identificación del supergrupo de *Wolbachia* se realizó estimando un árbol filogenético a partir de las secuencias obtenidas junto con las seleccionadas de las bases de datos, todas alineadas y recortadas para que tuvieran la misma longitud. Mediante inferencia Bayesiana usando el software MrBayes (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) se obtuvo la topología de un árbol filogenético. Se realizaron dos análisis simultáneos con cuatro cadenas cada uno durante 5.000.000 de generaciones muestreando cada 1000

generaciones y eliminando el 25% de los árboles obtenidos en los primeros muestreos. Con el 75% restante se calcula el árbol consenso que cumpla la regla de la mayoría del 50% y las probabilidades posteriores. El modelo evolutivo varió según las secuencias y fue estimado usando un test de razón de probabilidad jerárquica mediante el programa jModeltest (Posada, 2008).

También se hicieron análisis para identificar posibles eventos de recombinación usando el método MaxChi (Smith, 1992) implementado en la página web <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/CSE/test/> (Piganeau y col., 2004) y el programa informático START2 (Jolley y col., 2001). Con este último programa además se clasificaron las secuencias tipo (ST) en complejos ST.

Análisis estadísticos

Para comparar las diferencias de las frecuencias de infección entre poblaciones y sexos se ha utilizado un test de χ^2 , con la corrección de Yates en aquellas situaciones donde una de las categorías tuviera un valor menor de 5 para las frecuencias esperadas. Se han calculado los residuos tipificados corregidos (Haberman, 1973) para identificar aquellas frecuencias observadas que se desviaban significativamente de las esperadas. Cuando lo que se quieren comparar son las medias, se utiliza un test de ANOVA de uno o dos factores si los datos siguen una distribución normal y un test de U de Man-Whitney si los datos no se ajustan a dicha distribución. Esto se ha llevado a cabo con el programa informático SPSS v17 (IBM) y en el Microsoft Excell 2011 v14 (Microsoft). El nivel de significación usado en todos los test fue de α igual a 0,05.

Tabla 5. Secuencias del gen 16S rRNA y wsp obtenidas de la base de datos GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) utilizadas para diagnosticar la infección de *Wolbachia* en Cp.

Gen	Especie	Supergrupo	Número de acceso
16S rRNA	<i>Brugia malayi</i>	d	AF051145.1
	<i>Bryobia praetiosa</i>	b	EU499317.1
	<i>Bryobia spec.</i>	k	EU499316.1
	<i>Ctenocephalides felis</i>	i	AY335923.1
	<i>Diabrotica virgifera</i>	a	WSU83098
	<i>Dipetalonema gracile</i>	j	AJ548802.1
	<i>Dirofilaria repens</i>	c	AJ276500.1
	<i>Drosophila sechellia</i>	a	U17059.1
	<i>Folsomia candida</i>	e	AF179630.1
	<i>Gryllus integer</i>	b	U83094.1
	<i>Gryllus pennsylvanicus</i>	b	U83090.1
	<i>Litomosoides sigmodontis</i>	d	AF069068.1
	<i>Mansonella ozzardi</i>	f	AJ279034.1
	<i>Mansonella perstans</i>	f	AY278355.1
	<i>Mesaphorura macrochaeta</i>	e	AJ422184.1
	<i>Muscidifurax uniraptor</i>	a	L02882.1
	<i>Nasonia giraulti</i>	b	M84689.1
	<i>Nilaparvata lugens</i>	b	FJ774974.1
	<i>Onchocerca gibsoni</i>	c	AJ276499.1
	<i>Onchocerca gutturosa</i>	c	AJ276498.1
	<i>Orchopeas leucopus</i>	i	AY335924.1
	<i>Pentastiridius leporinus</i>	?	FN428797.2
	<i>Pseudolynchia canariensis</i>	f	DQ115537.1
	<i>Rhinocyllus conicus</i>	f	M85267.1
	<i>Supella longipalpa</i>	f	FJ152097.1
	<i>Aedes albopictus</i>	a	DQ842453.1
wsp	<i>Brugia malayi</i>	d	AE017321.1
	<i>Diabrotica virgifera</i>	a	DQ091309.1/AY138260.1
	<i>Dirofilaria repens</i>	c	AJ252176.1
	<i>Drosophila sechellia</i>	a	AF468035.1
	<i>Gryllus firmus</i>	b	DQ842474.1
	<i>Litomosoides sigmodontis</i>	d	AF409112.1/AJ252177.1
	<i>Muscidifurax uniraptor</i>	a	AF020071.1/DQ842476.1
	<i>Nasonia giraulti</i>	b	AY622512.1/DQ842477.1
	<i>Nilaparvata lugens</i>	b	FJ713760.1
	<i>Onchocerca gibsoni</i>	c	AJ252178.1
	<i>Onchocerca gutturosa</i>	c	AJ276497.1
	<i>Pentastiridius leporinus</i>	?	EU130542.1
	<i>Supella longipalpa</i>	f	EF193198.1/DQ354918.1
	<i>Drosophila innubila</i>	a	DQ842464.1
	<i>Drosophila neotestacea</i>	a	DQ842465.1
	<i>Camponotus pennsylvanicus</i>	a	DQ842460.1
	<i>Acraea encedon</i>	b	DQ842454.1/AJ130716.1
	<i>Drosophila bifasciata</i>	a	DQ842463.1
	<i>Encarsia formosa</i>	b	DQ842471.1
	<i>Acromis sparsa</i>	a	DQ842456.1
	<i>Teleogryllus taiwanemma</i>	b	DQ842485.1
	<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>	b	DQ842462.1
	<i>Chelymorphia alternans</i>	b	DQ842458.1
	<i>Armadillidium vulgare</i>	b	DQ842457.1
	<i>Cimex lectularius</i>	f	DQ842459.1

Tabla 6. Secuencias multilocus de la base de datos *Wolbachia* MLST (http://pubmlst.org/perl/mlstdbnet/mlstdbnet.pl?file=wo_isolates.xml), usadas para ubicar filogenéticamente las cepas de *Wolbachia* detectadas en *Chorthippus parallelus*.

Especie	Supergrupo	Número de identificación
<i>Zootermes angusticollis</i>	h	207
<i>Cimex lectularius</i>	f	36
<i>Opisthophthalmus capensis</i>	f	43
<i>Apoica pallens</i>	f	164
<i>Brugia malayi</i>	d	37
<i>Drosophila simulans</i>	b	26
<i>Culex pipiens</i>	b	29
<i>Nacaduba angusta</i>	b	101
<i>Drosophila recens</i>	a	9
<i>Nasonia vitripennis</i>	a	18
<i>Formica occulta</i>	a	103

RESULTADOS

Caracterización de las poblaciones de *Chorthippus parallelus*

El cromosoma X

El análisis del patrón de bandas C que presenta cada individuo en el cromosoma X se realizó en metafase I. En este estadio de la meiosis de los machos es fácil identificar el cromosoma sexual, pues, por su carácter hemicigótico, los machos son X0, el cromosoma X se desplaza de la placa metafásica como univalente antes que los cromosomas autosómicos (figura 6). Para establecer el patrón de cada individuo se observaron, al menos, 10 placas metafásicas. En total se estudió esta característica en 106 individuos de 5 poblaciones distintas, todas ellas ubicadas en el Puerto Viejo de Sallent de Gállego. Como se ha descrito en la introducción, este paso es una alternativa al de Portalet en el transecto que une el valle de Tena y de de Ossau. Pero mientras las poblaciones del paso de Portalet han sido ampliamente estudiadas (Ferris y col., 1993; Serrano, 1994; Serrano y col., 1996), las del Puerto Viejo de Sallent han sido descritas sólo a partir de la banda P, característica de Cpp, y con poco número de muestras (Ferris y col., 1993). Hay que destacar el hecho de que la mayoría de las clinas estudiadas tienen sus centros en estos puertos que son las áreas de mayor altitud (alrededor de los 1800 m) de la zona de contacto (ver revisión Shuker y col., 2005b).

Se encontraron 4 bandas heterocromáticas diferentes según su disposición en el cromosoma sexual: una banda pericentromérica (C), una proximal (E), una intersticial (H) y una distal (P), clasificadas según el criterio de Serrano y col. (1996) (figura 7). Las

diferentes combinaciones posibles de estas bandas en un mismo cromosoma X son 8: C, CE, CP, CEP, CH, CHP, CEH y CEHP, teniendo en cuenta que la banda de la región centromérica está siempre presente (Gosálvez y col., 1988) (figuras 2, 3 y 7). Esto implica, pues, que en las poblaciones de *Cp* se pueden encontrar, potencialmente, hasta 8 morfotipos del cromosoma X. De éstos, 6 han sido detectados entre los individuos de todas las poblaciones analizadas en este estudio (figura 8). El número de individuos encontrado para cada uno de estos patrones de bandas se presenta en la tabla 7. Así pues 6 muestras han mostrado el patrón C; 12 el CE; 65 el CP; 20 el CEP; 1 el CH y 2 el CHP. Como se ha comentado anteriormente y se puede, además, deducir de estos resultados, la banda pericentromérica está presente en todos los individuos estudiados. Además, el morfotipo más extendido es el CP presente en 65 de los 106 individuos analizados. También cabe destacar que se han observado menos individuos con el morfotipo CEP de los que cabría esperar estadísticamente si estas bandas se distribuyeran al azar entre ellas (χ^2 : 11,94, gl: 1, $p=0,001$).

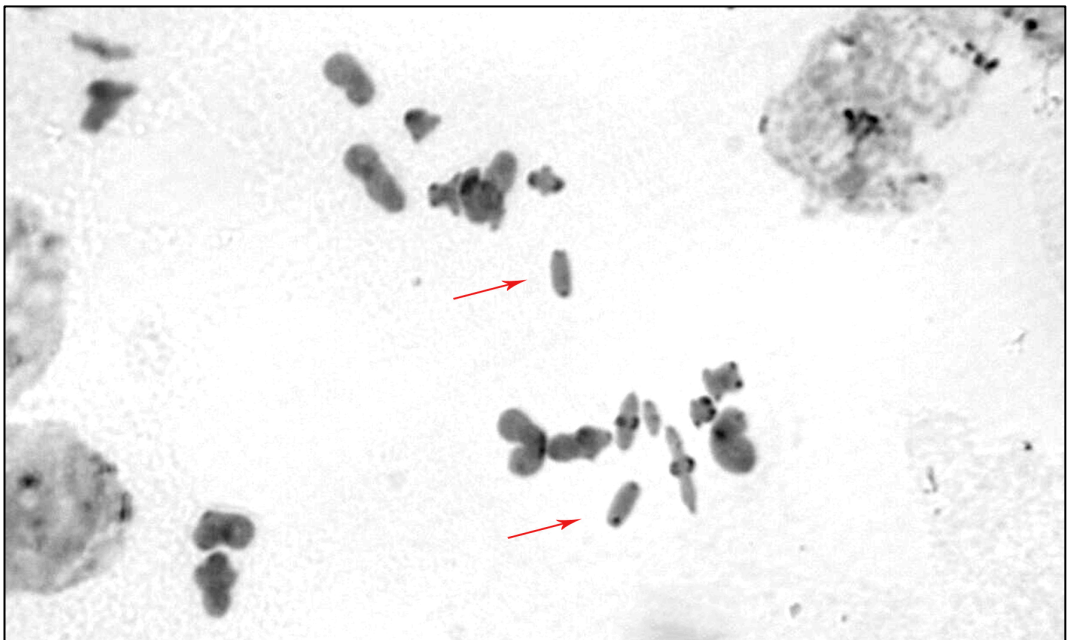


Figura 6. Meiocitos en metafase I de *C. parallelus* teñidos con Giemsa después del tratamiento de bandeado C. Las flechas rojas señalan los cromosomas X, que en este caso corresponden al patrón de bandas C y E representado en la figura 7c.

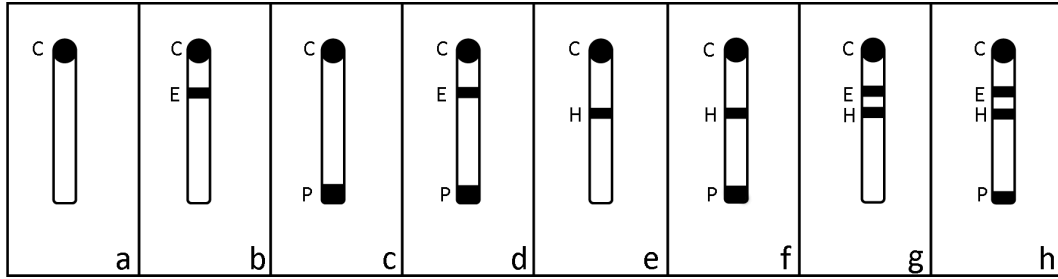


Figura 7. Posibles patrones de bandas C en los cromosomas X de *Chorthippus parallelus*. Corresponden con los encontrados en las poblaciones de *Chorthippus parallelus* en la zona de contacto del valle de Tena y de Ossau por Serrano y col. (1996). Extraído de Bella y col. (2007).

Si lo que se analiza son las diferentes bandas como caracteres independientes, de los 106 individuos, 87 presentaban la banda P, 32 la banda E, 3 la banda H y 6 ninguna banda, a parte de la centromérica. De los 3 individuos que portaban la banda H, dos de ellos no tenían más bandas y el tercero presentaba, además, la banda P. Por otro lado, de los que mostraban la banda E, 12 la tenían sola, y 20 junto con la banda P, la cual, aparecía de forma única en 65 de los 87 individuos que la presentaban (tablas 7 y 8). Lo que se observa es una presencia mayoritaria de la banda P, pues el 82% de los individuos analizados la portan.

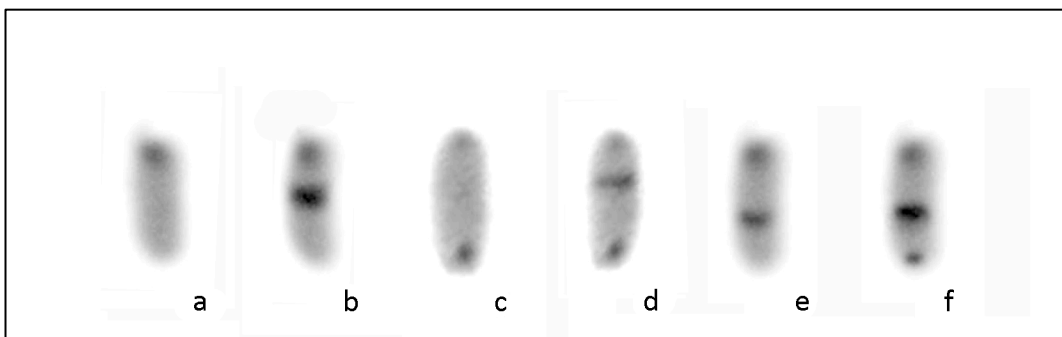


Figura 8. Los 6 patrones de bandas C en cromosomas X de *Chorthippus parallelus* en metafase I encontrados en el presente estudio en las poblaciones analizadas. a) Banda C; b) Bandas C y E; c) Bandas C y P; d) Bandas C, E y P; e) Bandas C y H; f) Bandas C, H y P.

Tabla 7. Número de individuos de *Chorthippus parallelus* para cada patrón de bandas heterocromáticas del cromosoma X detectados por población y totales. C, banda pericentromérica. E, banda proximal. P, banda distal. H, banda intersticial. Las poblaciones de PV1 a PV5 corresponden a las poblaciones del Puerto Viejo de Sallent del 1 a 5, la 1 es la más meridional y la 5 la más septentrional (ver figura 5 de material y métodos, página 29).

Patrón de bandas	Población					Total
	PV1	PV2	PV3	PV4	PV5	
C	2	1	2	1	0	6
CE	7	1	2	2	0	12
CP	17	14	7	14	13	65
CEP	2	8	9	0	1	20
CH	1	0	0	0	0	1
CPH	0	1	0	1	0	2
Total	29	25	20	18	14	106

Tabla 8. Frecuencias de las bandas detectadas en cada población independientemente de si aparecen con otras o no. E, banda proximal. P, banda distal. H, banda intersticial. O, cromosomas que presentan únicamente la banda pericentromérica. Las poblaciones de PV1 a pPV5 corresponden a las poblaciones del Puerto Viejo de Sallent del 1 a 5, la 1 es la más meridional y la 5 la más septentrional (ver figura 5 de material y métodos, página 29).

Banda	Población					Total
	PV1	PV2	PV3	PV4	PV5	
E	9	9	11	2	1	32
P	19	23	16	15	14	87
H	1	1	0	1	0	3
O	2	1	2	1	0	6
Total	29	25	20	18	14	106

Los 106 individuos analizados pertenecían, según el diseño experimental, a 5 poblaciones diferentes en el Puerto Viejo de Sallent. Éste se presenta como un nexo alternativo al de Portalet en el transecto que recorre los valles de Tena y de Ossau en la zona híbrida de Cp en los Pirineos. Los datos obtenidos permiten el análisis del patrón de bandas heterocromáticas en el cromosoma X desde una perspectiva poblacional. Pudiéndose observar unas frecuencias similares y bajas de individuos con banda H entre todas las poblaciones, un predominio de la banda P en todas las poblaciones y unas llamativas tendencias inversas en las clinas que describen las bandas P y E. La primera

más abundante en las poblaciones de la vertiente norte y la segunda en las de la sur. (figura 9).

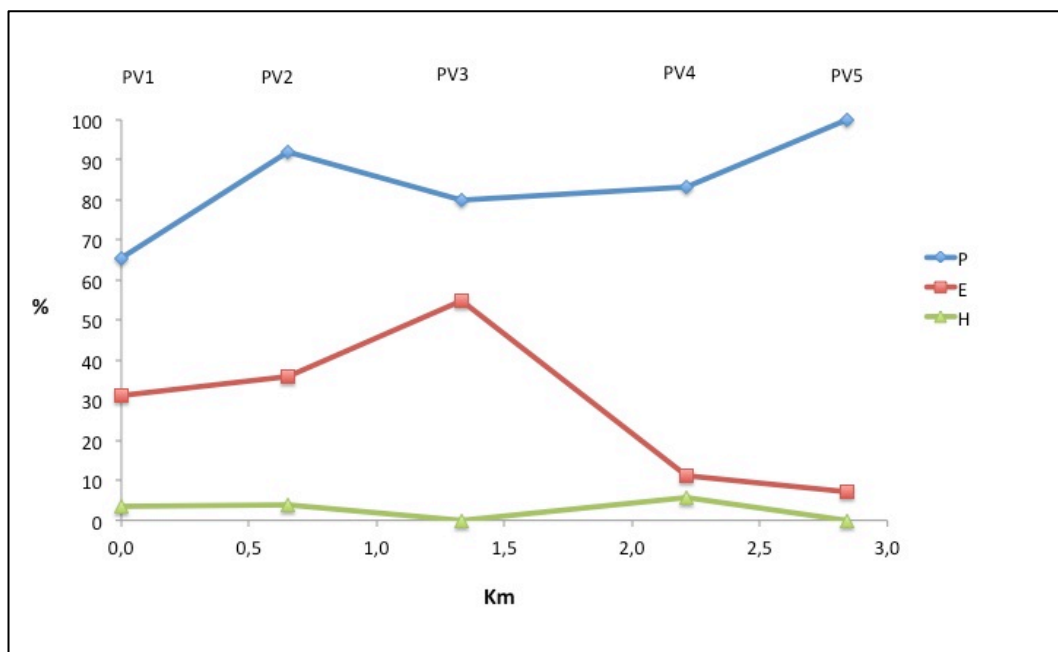


Figura 9. Representación de las frecuencias de las bandas E, P y H, a lo largo del Puerto Viejo de Sallent. Se toma como origen la población de Puerto Viejo de Sallent 1, en España. PV1 a PV5 corresponden a las poblaciones del Puerto Viejo de Sallent del 1 a 5, siendo la 1 y 2 las más meridionales, en el valle de Tena (España), la 3 en el collado de Peiralún y la 4 y 5, las más septentrionales, en el valle de Ossau (Francia) (ver figura 5 de material y métodos, página 29).

Además de estos análisis, se realizó una FISH con una sonda del fragmento del ITS1 de 600 pb en individuos híbridos de las poblaciones del Puerto Viejo de Sallent. Mediante esta técnica se confirma la presencia de las secuencias ribosomales en los brazos cortos de los cromosomas L2 y L3, en disposición proximal y distal respectivamente según lo descrito en trabajos anteriores (Bella y col., 2007). El cromosoma X de la subespecie Cpp muestra estas secuencias en posición distal coincidiendo con la presencia de una banda heterocromática en esa posición, la banda P, representativa de la subespecie (figura 10).

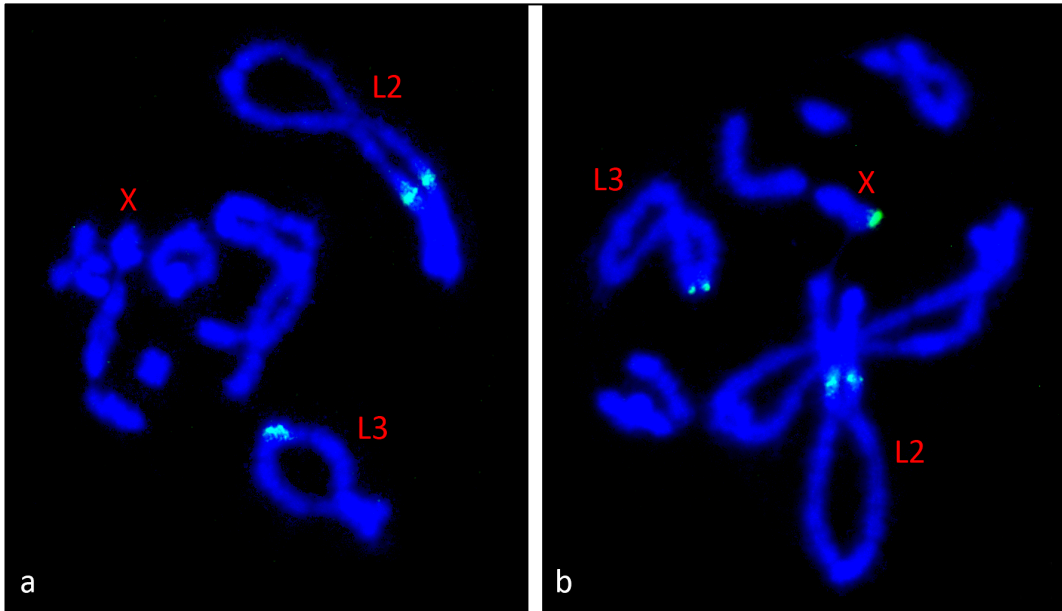


Figura 10. FISH con una sonda de ADN ribosómico (en verde) sobre meiocitos en diplotene de (a) un individuo de PV1 cuyo cromosoma X mostraba banda E, y (b) de un individuo de la población PV5 con banda P en su cromosoma sexual. Se observa la misma señal de hibridación en ambas muestras en los cromosomas largos (L2, L3), y únicamente en el cromosoma sexual (X) de la placa b. No se ha observado señal de hibridación en otras localizaciones.

Los microsatélites

Se han probado 9 parejas de *primers* que amplifican 9 microsatélites diferentes descritos por Abercrombie y colaboradores (2009): H5, F1, D6, H12, F9, D2, G5, D7 y D5 (ver tabla 3, página 37).

Como estas secuencias son muy polimórficas y se describieron a partir de individuos de *Chorthippus parallelus* pertenecientes a poblaciones alemanas, presumiblemente Cpp, se hizo un ensayo previo de cada marcador en un número reducido de muestras de las poblaciones que se han estudiado en este trabajo. Para ello se amplificaron mediante PCR estas secuencias a partir de ADN de 30 individuos, 10 pertenecientes a poblaciones híbridas y 20 a poblaciones puras, 10 de Cpp y 10 de Cpe. Una vez obtenidos los productos de estas reacciones se corrieron en un gel de agarosa. De los 9 marcadores,

todos, menos el D5, amplificaron correctamente en más del 90% de los individuos analizados y el tamaño del producto de PCR obtenido se encontraba dentro de los rangos esperados, entre 150 y 500 pb. El D5, aunque también dio unos tamaños de amplificado acorde a lo esperado, sólo lo hizo en el 6% de los individuos analizados. Así pues, se decidió no trabajar con este marcador. Además, para corroborar que los productos amplificados eran secuencias repetidas, como control se secuenciaron muestras de cada marcador amplificado.

Una vez que se decidió trabajar con 8 marcadores, se dividieron éstos en dos grupos, pues como se explica en los métodos, para genotipar cada marcador de un individuo se realiza una amplificación con uno de los *primers* conjugado con un fluorocromo. El secuenciador usado (ABI 3700, Applied Biosystem) reconoce hasta 5 fluorocromos distintos. Si uno de ellos queda reservado para el marcador de tamaño, quedan 4 para otros tantos marcadores diferentes, así pues, se pueden genotipar 8 marcadores de un individuo en dos lecturas. En este sentido y con idea de reducir costes, se intentó amplificar los 8 marcadores para un individuo en dos reacciones de PCR *multiplex*.

Después de varias pruebas en diferentes muestras no se consiguieron buenos resultados, pues en algunos casos había alelos que no amplificaban mediante esta técnica y sí mediante una PCR convencional. Además, el rendimiento de la amplificación de algunas secuencias era menor que el de otras y esto era un problema a la hora de genotipar las muestras, pues algunos canales se saturaban y daban falsos picos de fluorescencia en el resto. Así pues, se decidió amplificar en cada reacción de PCR un único marcador, para posteriormente juntar 4 marcados con distintos fluorocromos. De esta manera, si alguno de ellos aparecía con una señal intensa, se podía diluir de forma independiente. El método final de trabajo está descrito en los materiales y métodos (páginas 36 a 39). En la figura 11 se muestra el resultado de la lectura de los productos de PCR obtenidos con *primers* marcados con distintos fluorocromos. En la imagen se pueden observar en cada fila una muestra, con 4 marcadores amplificados y marcados en 4 diferentes colores diferentes, verde (VIC), amarillo (NED), rojo (PET) y azul (6-FAM), y un marcador de tamaño en naranja (LIZ). Luego, mediante el uso de un programa

informático, se obtiene un histograma de cada muestra dónde se representa la intensidad de fluorescencia (eje de las ordenadas), como indicador de la cantidad de fragmento amplificado, y distancia recorrida por el fragmento (eje de las abscisas) según su tamaño (figura 12). El tamaño de los fragmentos de los microsatélites amplificados, azul y verde en la figura, se infiere a partir de los tamaños conocidos del marcador de tamaño (naranja).

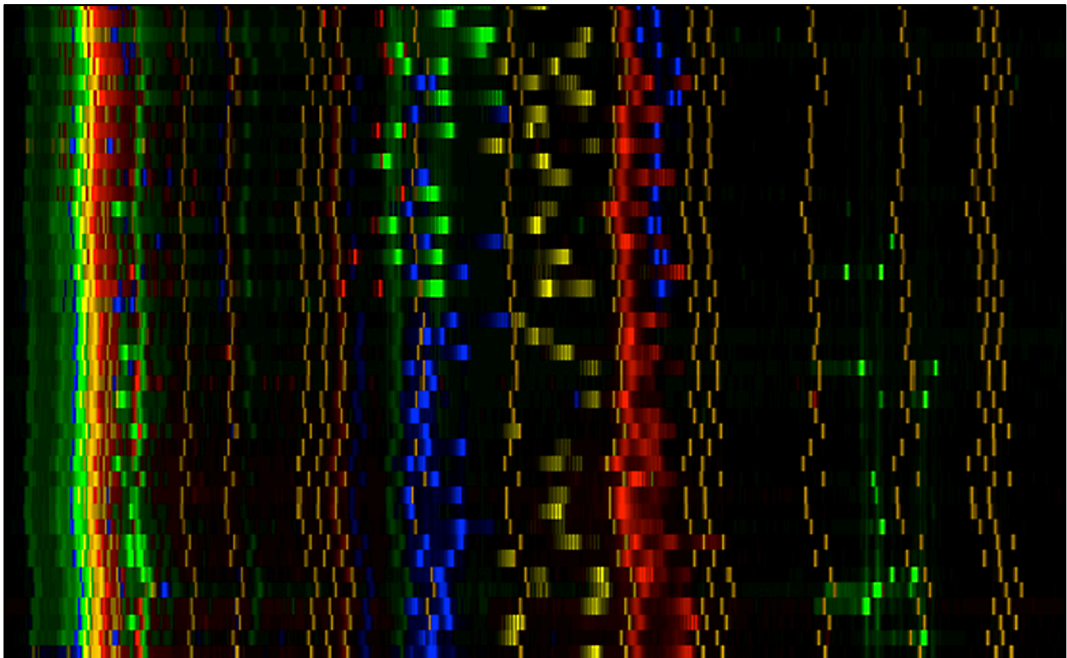


Figura 11. Imagen de una electroforesis capilar mostrando amplificados de PCR obtenidos con *primers* marcados con fluorocromos. Cada fila es un capilar y de izquierda a derecha se muestran los fragmentos de ADN de menor a mayor tamaño. Los colores rojo, azul, verde y amarillo corresponden a productos de diferentes loci marcados con distintos fluorocromos. El color naranja corresponde al marcador de tamaño.

De esta manera se realizó el genotipado para 8 marcadores en 100 individuos, 50 machos y 50 hembras pertenecientes a 5 poblaciones distintas: Escarrilla (Cpe), Puerto Viejo 1, Puerto Viejo 3 y Puerto Viejo 5 (híbridos) y Gabas (Cpp). Todas ellas pertenecientes al transecto del valle de Tena y de Ossau, con el fin de analizar la estructura genética de las poblaciones de dicha región de contacto entre Cpp y Cpe. Los

genotipos obtenidos están detalladamente expuestos en la tabla del apéndice 1, a partir de la cual se realizan todos los cálculos poblacionales.

Todos los marcadores elegidos previamente han amplificado correctamente, excepto el D2, del que no se ha obtenido amplificación en el 33% de las muestras, un porcentaje que no se había detectado en los análisis previos. El número de alelos identificados para cada marcador es muy variable, de 7 a 42, con una media de 28,8 alelos por locus (tabla 9). Consideramos como alelo a cada una de las variantes de tamaño detectadas mediante esta técnica, para cada locus concreto. El marcador que aparece como más polimórfico es el G5 y el menos el H5. No todas las poblaciones presentan el mismo número de alelos y en ninguna se ha detectado la totalidad de ellos, siendo unas más ricas que otras según los distintos marcadores, sin presentar una tendencia clara. Aunque los niveles de riqueza alélica por población y locus, con un rango de 5,35 a 20,01, hablan de unos marcadores muy polimórficos.

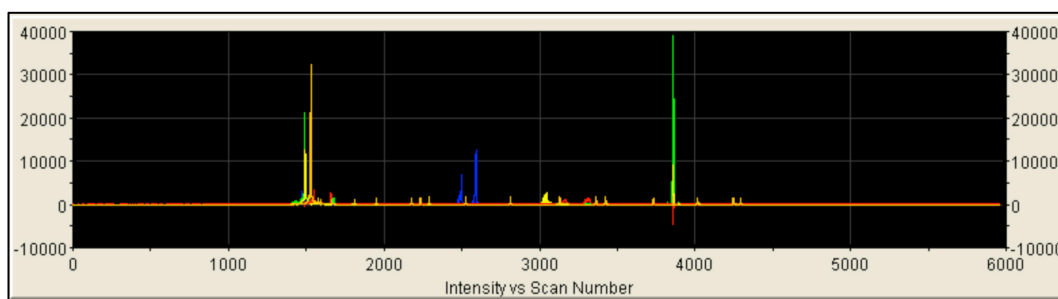


Figura 12. Histograma que representa en el eje Y la intensidad de fluorescencia y en el X la distancia recorrida por un fragmento de PCR previamente amplificado con un *primer* conjugado con un fluorocromo. El tamaño de los fragmentos de PCR amplificados, representados en azul y verde en este caso, se infiere a partir de los tamaños conocidos del marcador de tamaño (naranja).

Tabla 9. Número de alelos por locus y población identificados. En la última fila se recogen el número total de alelos por locus encontrado en todas las poblaciones. Éstos totales no corresponden con la suma de cada columna, pues muchos alelos están presentes en varias poblaciones. N = 100. ES = Escarrilla, PV = Puerto Viejo de Sallent (1, vertiente sur; 3, collado; 5, vertiente norte), GA = Gabas.

Locus	Población					Total
	ES	PV1	PV3	PV5	GA	
H5	5	6	5	5	3	7
H12	13	8	12	13	11	32
G5	19	13	19	17	10	42
F9	9	11	12	12	12	29
F1	13	13	13	14	10	30
D7	16	5	7	6	11	24
D6	17	12	14	16	17	40
D2	13	7	10	4	14	26

La heterocigosidad observada (H_o), medida de variabilidad genética inferida a partir del porcentaje medio observado de loci heterocigóticos por individuo, varía entre 0,37 y 0,87 si se calcula agrupando los resultados de todas las poblaciones (Tabla 10). Excepto el marcador D7 que aparece con una H_o superior a la heterocigosidad esperada (H_e) (0,87 y 0,76 respectivamente, $p=0,0035$), todos presentan una H_o inferior y significativamente distinta de la H_e ($p \leq 0,05$). Entre ellos, el marcador D2 es el que presenta la mayor diferencia entre la H_o , de 0,37, y la H_e , de 0,87. De todas formas, dado que este marcador no se ha conseguido amplificar en un 33% de las muestras, pudiendo producir desviaciones en los cálculos de estimadores, se ha decidido prescindir de él para el resto de los análisis. Si se analiza la heterocigosidad por poblaciones, los resultados son acordes con lo que se acaba de describir (tabla 11). De nuevo el marcador D7 es el único que muestra valores de heterocigosidad observados mayores de los esperados, aunque estas diferencias son sólo estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en las poblaciones ubicadas en el Puerto Viejo de Sallent. En lo que respecta al resto de marcadores, todos siguen mostrando unas H_o menores de las H_e en la mayoría de las comparaciones. Aunque caben destacar dos detalles, uno es el hecho de que la población de Escarrilla es la que presenta un menor número de marcadores cuyas heterocigosidades se desvían de lo esperado en términos estadísticos (en tres de siete estudiados) y, el otro, es que los marcadores H5 y F9, también a nivel

estadístico, son los únicos que sólo se desvían de lo esperado en 2 de las 5 poblaciones analizadas (tabla 11).

Tabla 10. Heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) de cada locus analizado.

Locus	Ho	He
H5	0,41	0,56
H12	0,60	0,82
G5	0,63	0,93
F9	0,74	0,86
F1	0,59	0,85
D7	0,87	0,76
D6	0,66	0,92
D2	0,37	0,87

Tabla 11. Heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) de cada locus analizado por población. ES = Escarrilla, PV = Puerto Viejo de Sallent (1, vertiente sur; 3, collado; 5, vertiente norte), GA = Gabas. En rojo las Ho significativamente distintas de las He ($p \leq 0,05$).

Locus	Población									
	ES		PV1		PV2		PV5		GA	
	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He
H5	0,53	0,69	0,53	0,72	0,40	0,53	0,30	0,46	0,32	0,39
H12	0,68	0,89	0,50	0,72	0,68	0,80	0,61	0,88	0,50	0,82
G5	0,94	0,94	0,56	0,92	0,58	0,95	0,59	0,94	0,50	0,86
F9	0,53	0,80	0,74	0,89	0,85	0,85	0,80	0,86	0,78	0,89
F1	0,79	0,93	0,40	0,84	0,50	0,84	0,55	0,85	0,70	0,80
D7	0,95	0,91	0,89	0,68	0,80	0,65	1,00	0,76	0,72	0,81
D6	0,70	0,94	0,70	0,92	0,65	0,85	0,50	0,93	0,75	0,94

Estos resultados invitan a realizar un test para examinar si las muestras estudiadas se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg (EHW). Así pues, si el test de probabilidad para el EHW se realiza para todas las poblaciones y todos los loci, se obtiene una desviación del EHW con una significación muy alta ($p \leq 0,001$). Esto se corresponde con el resultado conseguido si el test se realiza para cada población. Esto puede ser debido, entre otras muchas cosas, a la presencia de alelos nulos, es decir, a que en algunos individuos uno de los alelos no haya sido detectado porque la secuencia diana del

primer haya mutado (Shaw y col., 1999). Para contrastar esta hipótesis se ha realizado un análisis con el software Micro-Checker (Van Oosterhout y col., 2004), y se ha detectado la posible presencia de alelos nulos en 4 marcadores, aunque sólo el marcador D6 muestra esta posibilidad en todas las poblaciones.

Otra cuestión que se puede estimar es si los loci estudiados están ligados o, por el contrario, se encuentran en equilibrio de ligamiento. Es decir, se parte de la hipótesis de que los genotipos en un locus dado son independientes de los que haya en otro locus. Para ello se tienen en cuenta los 100 individuos analizados en conjunto y se comparan por pares todos los loci para los que han sido genotipados. Así pues se han obtenido asociaciones no aleatorias entre los loci H5 y D6 (método de Fisher's, $\chi^2=23,39$; g.l. = 10; $p = 0,009$) y los loci F1 y D6 (método de Fisher's, $\chi^2=21,84$; g.l. = 10; $p = 0,016$). Pero si tenemos en cuenta cada pareja de loci en cada población, aparecen asociaciones no aleatorias en tres de las 105 comparaciones, en la población del Puerto Viejo de Sallent 3 entre los loci F1 y D6 ($p = 0,035$) y en la del Puerto Viejo de Sallent 5 entre los loci H5 y D6 ($p = 0,002$) y los loci H12 y D6 ($p = 0,007$).

La diferenciación genética entre poblaciones en los loci analizados, estimada a partir del estadístico F_{st} sobre todas las poblaciones y loci, fue significativa ($p = 0,0001$) pero no muy intensa ($F_{st} = 0,065169$). Ahora sí es importante destacar que una estimación de la diferenciación genética entre las poblaciones, por pares, muestra unas F_{st} mayores entre las poblaciones más lejanas (tabla 12). Se observa la menor diferenciación genética entre las poblaciones híbridas de Puerto Viejo 1 y 3 ($F_{st} = 0,007$) y la mayor entre las poblaciones puras, de distinta subespecie, de Escarrilla y Gabas ($F_{st} = 0,102$). Este parámetro se ha calculado también con la corrección ENA para la presencia de alelos nulos descrita por Chapuis y Estoup (2007). Como se puede comprobar en la tabla 12, los valores de F_{st} con y sin la corrección no difieren mucho, la mayor diferencia es de 0,007. Por otro lado, el valor medio de F_{is} es de 0,212, indicando que las desviaciones del equilibrio H-W y el defecto de heterocigotos detectados puedan ser debidos, entre otros posibles factores, a los procesos de endogamia detectados.

Tabla 12. Valores de F_{st} entre poblaciones con la corrección ENA (Chapuis y Estoup, 2007), por encima de la diagonal, y sin ella, por debajo de la diagonal. ES = Escarrilla, GA = Gabas, PV = Puerto Viejo de Sallent (1, vertiente sur; 3, collado; 5, vertiente norte)

Población	ES	PV1	PV3	PV5	GA	Fst con corrección ENA
ES		0,067	0,084	0,069	0,093	
PV1	0,075		0,007	0,023	0,092	
PV3	0,091	0,007		0,006	0,081	
PV5	0,076	0,026	0,009		0,072	
GA	0,102	0,093	0,088	0,078		
Fst sin corrección ENA						

El programa informático STRUCTURE (Evanno y col., 2005) permite identificar si las poblaciones o individuos en estudio se encuentran estructurados genéticamente en el mismo número de poblaciones que el investigador identifica por otro criterio: fenotípico, geográfico, etc. Esta aplicación permite calcular la probabilidad (Q) que tiene un individuo de pertenecer a un número determinado de grupos definidos (K). De esta manera, dependiendo de las Q obtenidas para cada individuo se estima una probabilidad posterior *ad hoc* de los datos para una K dada, $\Pr(X|K)$. Así pues, calculando $\Pr(X|K)$ para diferentes K, se puede identificar cuál es la de mayor probabilidad.

En este trabajo se ejecutó el programa fijando K de 1 a 7, se esperaban detectar entre uno y tres *clusters* y se repitió 8 veces, pues la variabilidad obtenida era muy reducida, para cada K dada. Una vez representada la media de $\Pr(X|K)$ y su intervalo de confianza al 95% para cada valor de K (figura 13), se ha identificado que el número de poblaciones genéticamente diferenciadas más probable es 3. Pues cuando K es igual a 3 se obtiene de manera significativa la probabilidad posterior *ad hoc* más alta (ANOVA de un factor; $F = 1676.04$, g.l. = 6, $p \leq 0.001$). De todas formas, el resultado más reseñable es la baja probabilidad de que las muestras provengan de una única población genética. Mostrando claramente la existencia de más de un *background* genético.

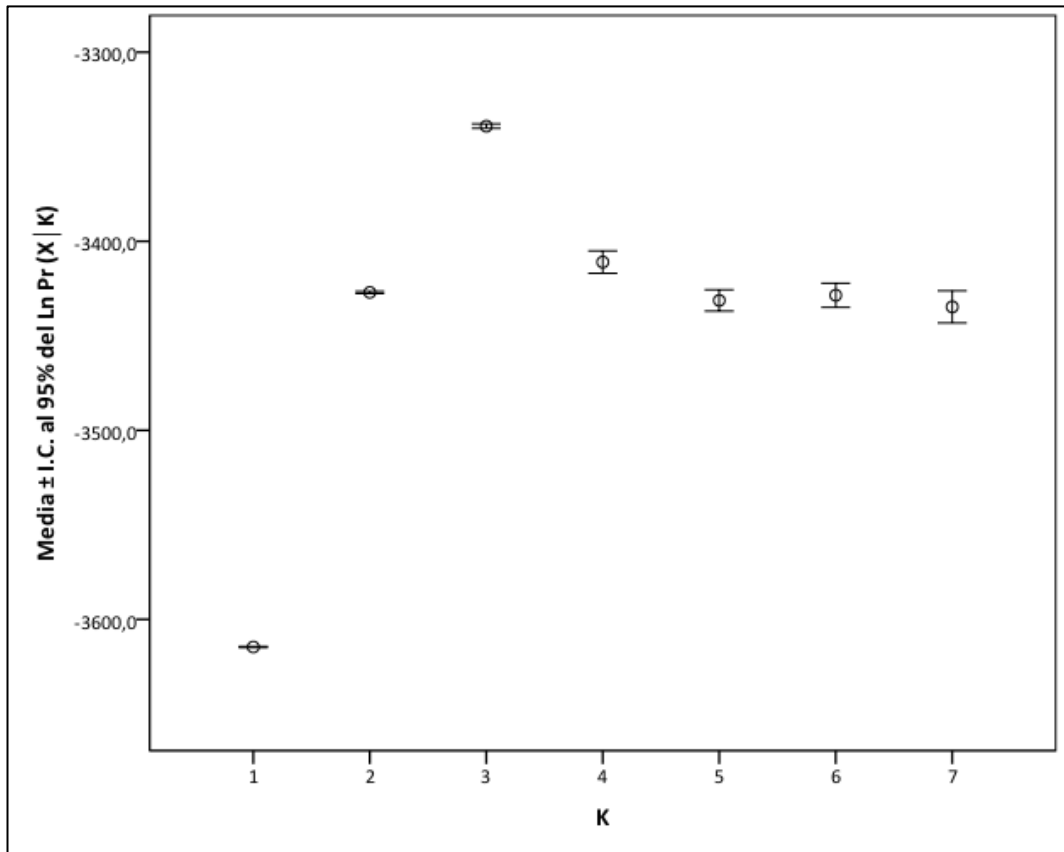


Figura 13. Probabilidad posterior *ad hoc* $\text{Pr}(X|K)$ de que los individuos genotipados estén estructurados en un número dado de poblaciones (K). $N = 8$, para cada K. El eje de las ordenadas representa las probabilidades y el de las abscisas el número de poblaciones.

Para visualizar cómo clasifica el programa a los individuos en las diferentes poblaciones o *clusters*, éstos se representan en un triángulo como puntos cuya posición en el área determina la probabilidad de pertenecer a cada uno de los 3 *clusters* representados. De esta manera, aquel individuo que se encontrara en el centro del triángulo tendría una probabilidad de descender de cada una de las poblaciones asignadas del 33% ($Q_1 = 0,33$, $Q_2 = 0,33$ y $Q_3 = 0,33$) o, si se encontrara en uno de los vértices, tendría una probabilidad del 100% de pertenecer a una población y una del 0% de pertenecer a las otras dos ($Q_1 = 1$, $Q_2 = 0$ y $Q_3 = 0$). En la figura 14 se puede identificar claramente cómo, de las tres poblaciones asignadas, una agrupa a los individuos Cpe recolectados en Escarrilla (*cluster 2*), otra agrupa principalmente a los Cpp recolectados en Gabas

(*cluster 1*) y la tercera agrupa a los individuos recolectados en las poblaciones híbridas del Puerto Viejo de Sallent (*all others*).

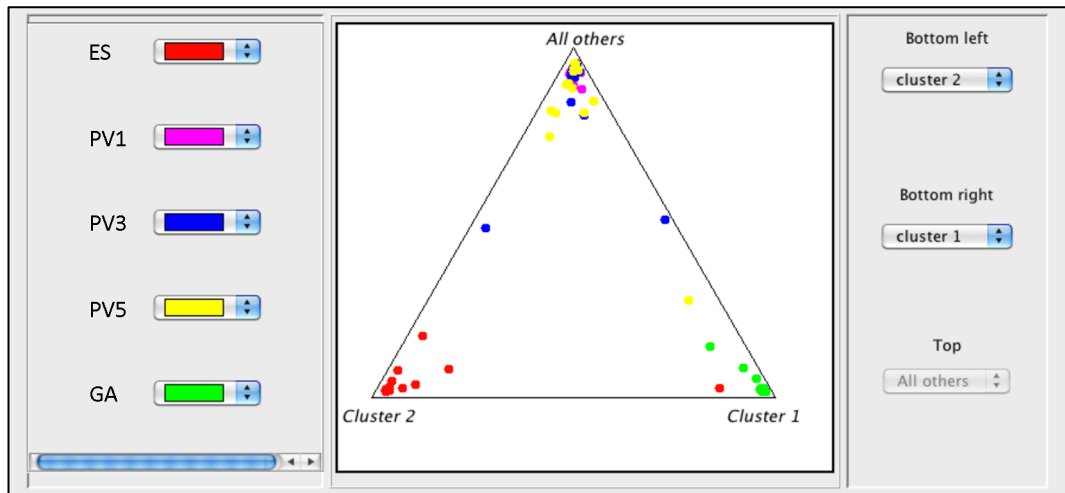
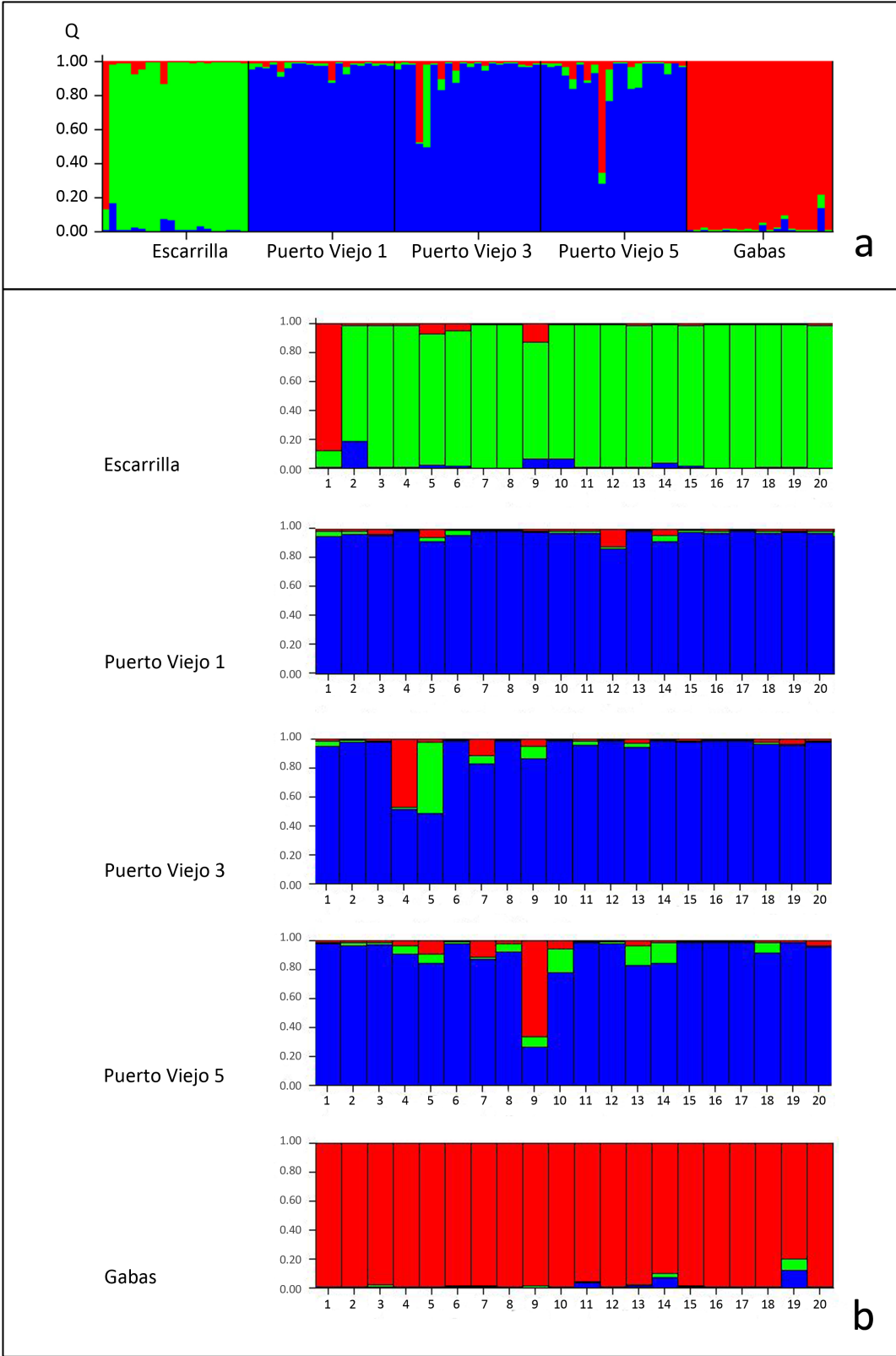


Figura 14. Clasificación de los individuos analizados usando el programa STRUCTURE según su estructura genética. Los colores indican el origen de cada individuo: rojos de Escarrilla (ES), rosas de Puerto Viejo 1 (PV 1), azules de Puerto Viejo 3 (PV 3), amarillos de Puerto Viejo 5 (PV 5) y verdes de Gabas (GA). N =20 en cada población. Su posición en el triángulo depende de la probabilidad de pertenecer a cada uno de los tres grupos.

Sin embargo, si nos fijamos de manera más detallada, hay individuos con una probabilidad (Q) que se aleja de la del resto de los individuos de su población natural. Para identificar a esos individuos se representa en un gráfico de barras apiladas a cada individuo con sus tres Q en una barra con tres colores, donde cada color indica la Q para uno de los clústeres forzados. En la figura 15, se puede observar que el individuo 1 de la población de Escarrilla tiene una probabilidad de pertenecer al *cluster* verde de $Q = 0,1$, mientras que tiene una probabilidad de pertenecer al rojo de $Q = 0,9$. Esta observación es bien distinta de la del resto de los individuos de Escarrilla, pues todos presentan una probabilidad mucho mayor de pertenecer al *cluster* verde, con valores de Q mayores del 80%. Los individuos del resto de poblaciones estudiadas presentan resultados similares, pues en general muestran una Q mayor para el mismo *cluster* que el resto de sus

congéneres, excepto el individuo 9 de la población de Puerto Viejo 5 cuya Q mayor (0,65) está asociada al *cluster* rojo, el mismo al que los individuos de Gabas muestran una mayor probabilidad de pertenecer.

Figura 15 (derecha). a) Gráfico de barras apiladas representando la agrupación de los individuos de todas las poblaciones analizadas mediante el programa STRUCTURE con $K = 3$. Cada barra representa un individuo y su probabilidad (Q) de pertenecer a uno de los tres grupos forzados (K) representados por los colores rojo, azul y verde. Las líneas negras agrupan las muestras recolectadas en la misma población. b) Detalle de los resultados de cada una de las poblaciones analizadas.



Caracterización de la infección por *Wolbachia* en la zona híbrida de *Chorthippus parallelus*

Caracterización de los supergrupos

Para determinar el tipo de infección por *Wolbachia* que presentan las poblaciones de *Chorthippus parallelus*, se ha amplificado y secuenciado un fragmento del gen *16S rRNA* de 1400 pb con los *primers* diseñados por Giordano y col. en 1995. Esto se ha hecho en 14 individuos en poblaciones ya estudiadas (Sallent de Gállego, Escarrilla y Gabas) y nuevas (Puerto Viejo de Sallent 1, 3 y 5) de la zona híbrida y de Sierra Nevada, con la idea de tener una muestra representativa, pues según los resultados de Zabal-Aguirre y col. (2010) los individuos de estas poblaciones están infectados al menos por dos supergrupos de *Wolbachia*. Una vez obtenidas las secuencias se ha comprobado que éstas presentaban homología con otras secuencias presentes en la base de datos de nucleótidos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante la herramienta BLAST. Seguidamente se han alineado y editado todas las secuencias mediante los programas informáticos ProSeq v3 y BioEdit usando el algoritmo ClustalW. Una vez editadas se han identificado en ellas 46 sitios polimórficos. De las 14 secuencias obtenidas, 8 se mostraron idénticas. Así pues los análisis se realizaron con las 6 secuencias tipo que eran distintas entre sí (SN.1, ES.2, PV1.1, PV2.2 y PV3.2)

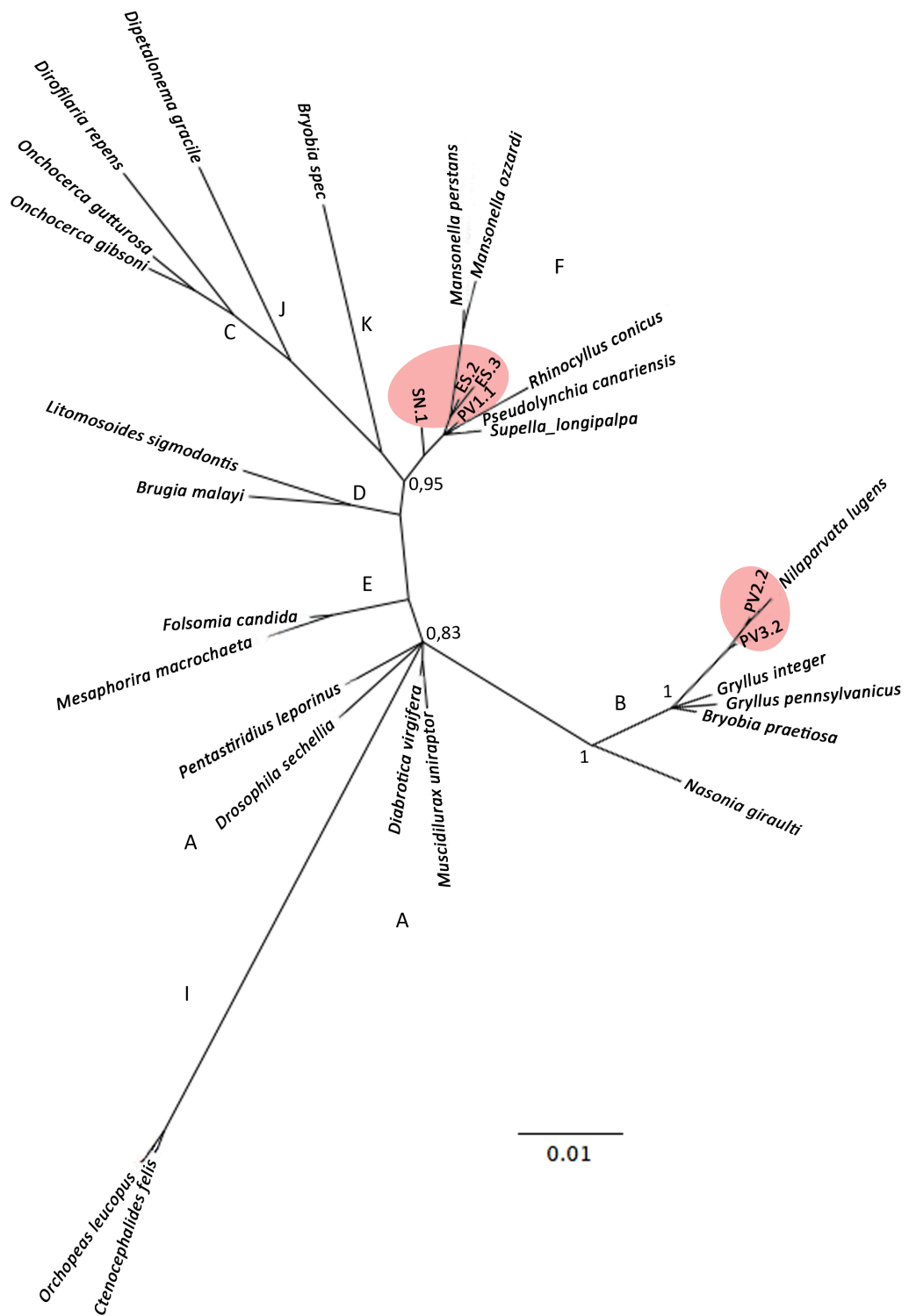
Para identificar a qué supergrupo de *Wolbachia* pertenecen estas secuencias se ha realizado un alineamiento con otras secuencias identificadas mediante un BLAST como homólogas y bien justificada su clasificación en la literatura (tabla 5, página 44). A partir de este alineamiento se ha obtenido mediante inferencia Bayesiana un árbol filogenético sin raíz que permite identificar a qué secuencias de las bases de datos son más afines las obtenidas en este trabajo (figura 16). Como se puede observar en este árbol filogenético, las 6 secuencias se encuentran en dos de los supergrupos de

Wolbachia descritos en la literatura, 4 de las secuencias tipo pertenecen al supergrupo F y 2 al supergrupo B (Breeuwer y col., 1992; Campbell y col., 1992; Werren y col., 1995; Giordano y col., 1997; Casiraghi y col., 2001; Dale y col., 2006; Keiser y col., 2008; Gibson y Hunter, 2009; Tang y col., 2010).

Para contrastar este resultado se ha realizado paralelamente y en los mismos individuos la amplificación del gen *wsp* de *Wolbachia*. Se ha seguido el mismo proceso que con las secuencias anteriores, una vez amplificadas y secuenciadas, se ha comprobado su homología mediante BLAST con las secuencias de las bases de datos (tabla 5, página 44). Se han alineado junto con algunas de las secuencias encontradas como homólogas y comprobado su clasificación en la bibliografía y se ha inferido un árbol filogenético mediante el software Mr Bayes (figura 17). En este caso nuestras secuencias se siguen presentando en dos grupos bien diferenciados. Uno de ellos ubicado, junto a la mayoría de las secuencias adjudicadas según la literatura al supergrupo B. Y el otro grupo, que forma un clado en sí mismo, sólo tiene el soporte de una de las secuencias del supergrupo F determinadas en estudios anteriores. Hay que destacar que este árbol, obtenido mediante las secuencias *wsp* de este trabajo más las encontradas en las bases de datos, presenta una incoherencia producida por parte de estas últimas, una secuencia del supergrupo B aparece en un mismo clado con las del linaje A.

De acuerdo con los resultados obtenidos, las cepas de *Wolbachia* presentes en Cp pertenecen a dos supergrupos, el B y el F. Este hecho permite la determinación del tipo de infección presente en un individuo mediante el diseño de unos *primers* específicos de supergrupo anidados en la secuencia del gen *16S rRNA* y, así, estimar la incidencia de estos supergrupos en las poblaciones estudiadas.

Figura 16 (derecha). Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana a partir del alineamiento de secuencias del gen *16S rRNA*. Las letras indican el supergrupo de *Wolbachia* al que pertenecen. Las secuencias originales de este trabajo son las señaladas en rojo, expresadas mediante un código en el que las letras hacen referencia a la población y el número al individuo. PV, Puerto Viejo; ES, Escarrilla; SN, Sierra Nevada. Las probabilidades posteriores están indicadas en los principales nodos.



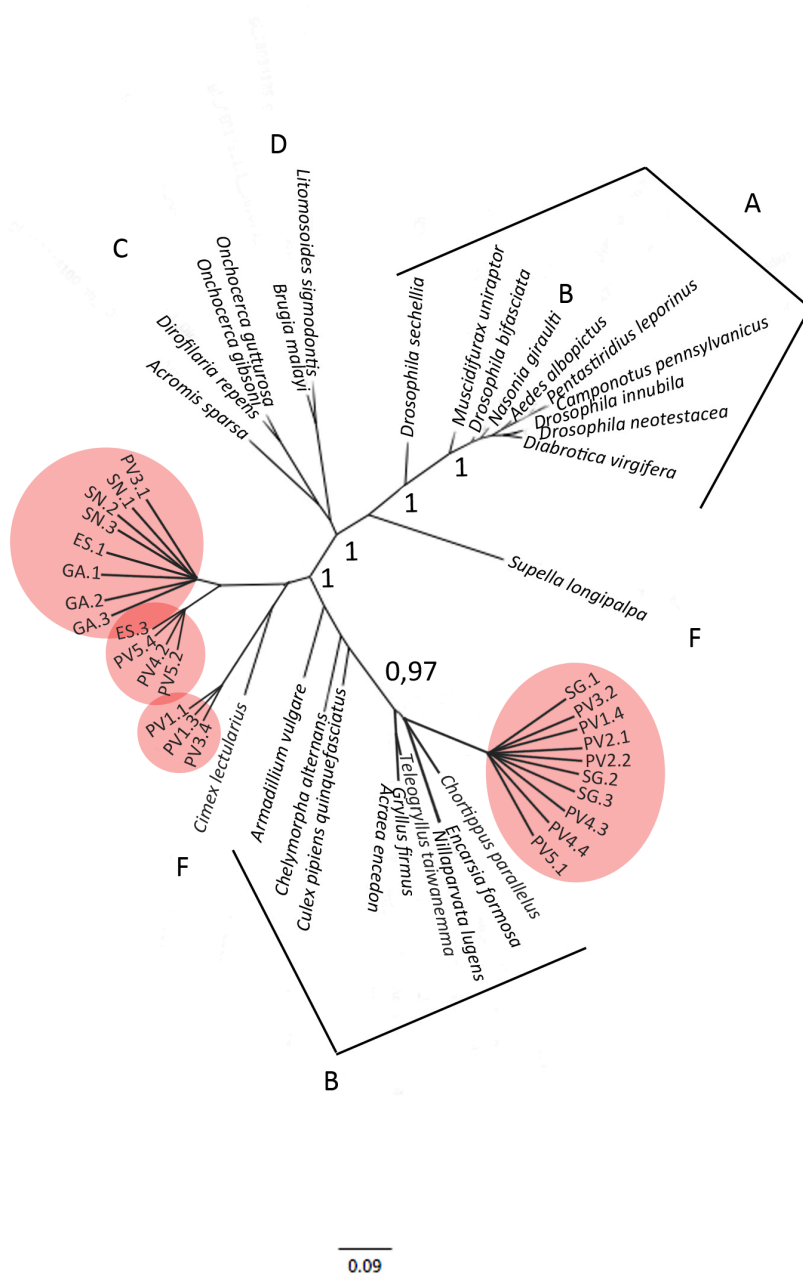


Figura 17. Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana a partir del alineamiento de secuencias del gen *wsp*. Las letras indican el supergrupo de *Wolbachia* al que pertenecen. Las secuencias originales de este trabajo son las señaladas en rojo, expresadas mediante un código en el que las letras hacen referencia a la población y el número al individuo. PV, Puerto Viejo; ES, Escarrilla; GA, Gabas; SN, Sierra Nevada. Las probabilidades posteriores están indicadas en los principales nodos.

Caracterización de la incidencia de infección por *Wolbachia* en las poblaciones de *Chorthippus parallelus*

Mediante PCR se ha estimado la frecuencia de infección para cada supergrupo en cada una de las poblaciones estudiadas (tabla 13). Todas las poblaciones de *Chorthippus parallelus* están infectadas por *Wolbachia* y por ambos supergrupos, aunque existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la incidencia de cada tipo en las distintas poblaciones (figura 18). Mientras algunas presentan una mayoría de infección por el supergrupo F, con su nivel más alto en Sierra Nevada (74,1%), otras lo tienen por el B. Otro dato destacable es que, en general, el nivel de individuos coinfectados es bajo. Como excepción la población de Sallent de Gállego tiene un nivel considerablemente alto, del 45%.

Tabla 13. Frecuencias absolutas de la infección por *Wolbachia* en las poblaciones de *Chorthippus parallelus* indicadas en la primera columna.

Población	Tipo de infección				Total
	No infectado	F	B	F y B	
Arudy	71	2	9	8	90
Gabas	35	9	10	8	62
L'Hermine	23	6	16	10	55
Soques	27	3	18	11	59
Cabaña Tourmont	46	4	10	3	63
Cabaña Antigua	44	0	6	1	51
Portalet	71	12	9	1	93
Puerto Viejo 5	29	8	12	3	52
Puerto Viejo 4	24	6	15	7	52
Puerto Viejo 3	32	7	9	6	54
Puerto Viejo 2	29	3	15	14	61
Puerto Viejo 1	31	6	21	8	66
Corral de Mulas	25	7	10	17	59
Sallent de Gállego	9	5	16	21	51
Escarrilla	42	34	5	7	88
Sierra Nevada	3	20	0	4	27
Total	541	132	181	129	983

Otra cuestión a tener en cuenta es si existen variaciones entre sexos en cuanto a la incidencia y el tipo de infección. No se han encontrado diferencias en este sentido, ni al tomar como conjunto a los individuos de todas las poblaciones, ni haciendo el análisis población a población. Esto apunta a que la infección afecta indistintamente tanto a machos como a hembras.

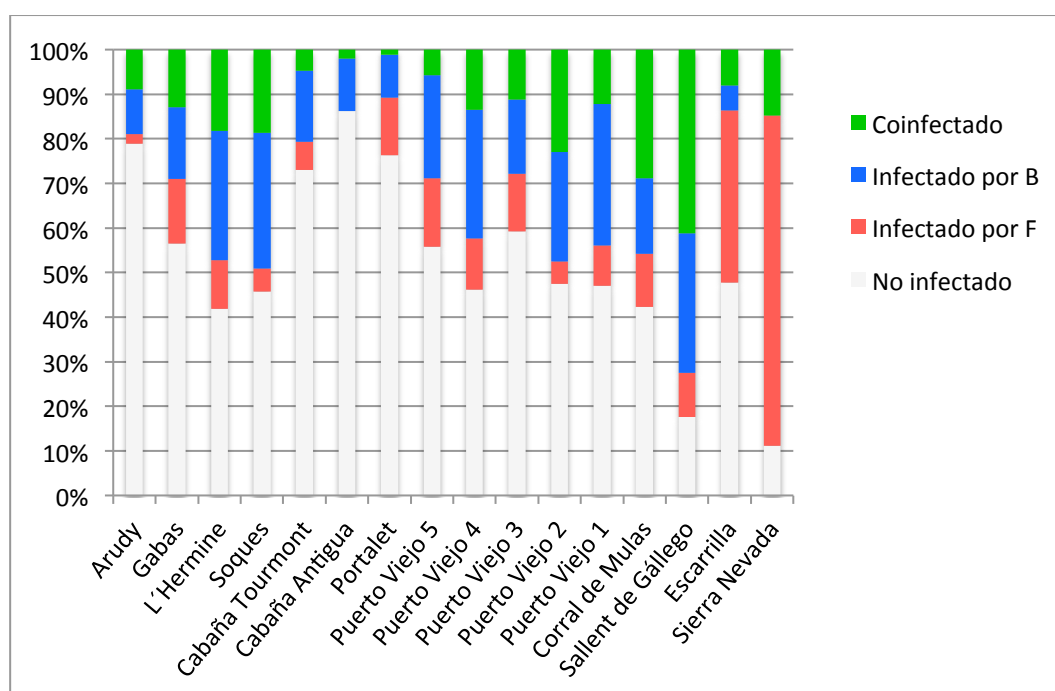


Figura 18. Representación de las frecuencias relativas de infección por *Wolbachia* en las poblaciones estudiadas de *Chorthippus parallelus*.

Por último, con objeto de identificar qué poblaciones, según su patrón de infección, son más similares, se ha llevado a cabo un estudio mediante la técnica estadística de agrupación de conglomerados jerárquicos. De esta manera se ha detectado un grupo de poblaciones muy similares entre sí, todas las pertenecientes a Francia y/o a la zona híbrida, excepto la de Sallent de Gállego, que junto con Escarrilla y Sierra Nevada, se agrupan independientemente del resto (figura 19).

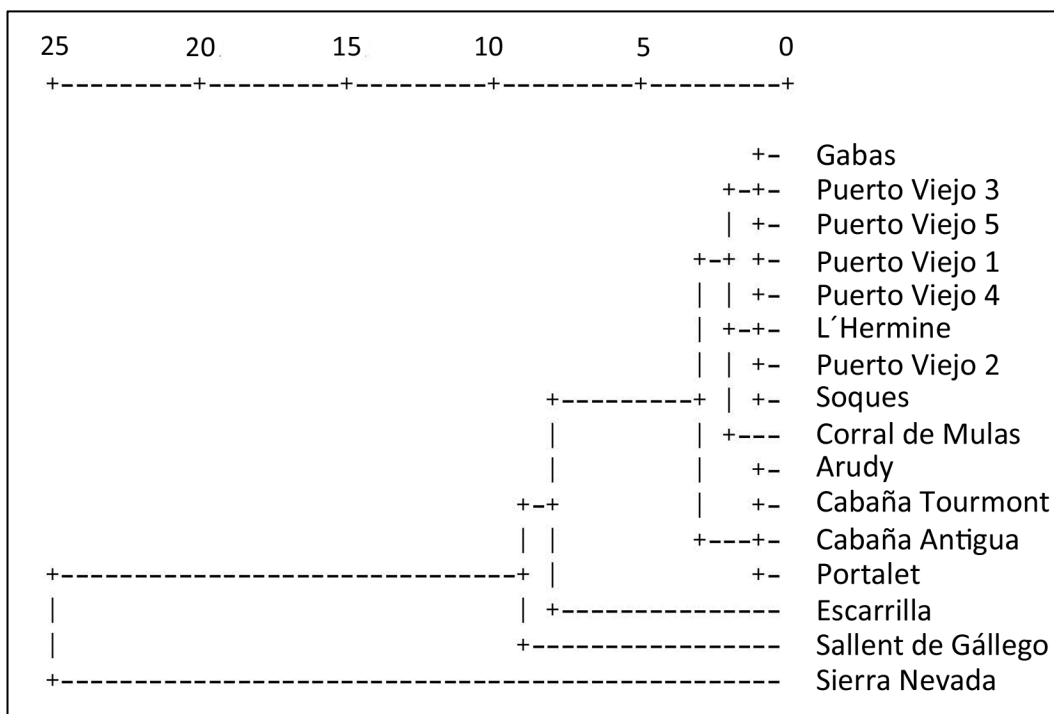


Figura 19. Dendrograma obtenido mediante el método de agrupación de los conglomerados jerárquicos. Las poblaciones se agrupan según las frecuencias de individuos que presentan infección por B, F, B y F y no infección.

Caracterización de las cepas de *Wolbachia* mediante un sistema multilocus

El sistema multilocus (MLST) aquí empleado para determinar las cepas de *Wolbachia*, se basa en métodos de epidemiología para identificar microorganismos. Fue propuesto por Baldo y col. en el año 2006 y consiste en amplificar 5 genes distribuidos, de manera más o menos equidistantes, por el cromosoma circular que constituye el genoma de *Wolbachia* y que presentan fuerte selección estabilizadora. Estos genes son: *coxa*, *fstz*, *fbpa*, *hcpa* y *gatb* (tabla 1, página 22). En este trabajo, se han corroborado los supergrupos a los que pertenecen las cepas de *Wolbachia* que infectan Cp, caracterizados primero con los genes *16S rRNA* y *wsp* y se ha descartado ya con carácter definitivo la existencia de otras cepas y supergrupos. Además, se han amplificado y secuenciado los fragmentos de los 5 genes del sistema multilocus en 37 individuos que

habían sido determinados anteriormente mediante los *primers* específicos del *16S rRNA* como infectados por un único supergrupo. Estos individuos pertenecen a las nuevas poblaciones en estudio de la zona híbrida de *Chorthippus parallelus* del Puerto Viejo de Sallent y a las poblaciones externas, Gabas, Escarrilla y Sierra Nevada (figuras 1 y 5, páginas 8 y 29 respectivamente). Una vez obtenidas las secuencias de los genes del sistema MLST, éstas se concatenan y se alinean con secuencias presentes en la base de datos “*Wolbachia* MLST Databases” (<http://pubmlst.org/wolbachia/>) (tabla 6, página 45) de las que ya se sabe a qué supergrupos pertenecen. Mediante inferencia bayesiana y a partir de las secuencias concatenadas de los 5 genes, se ha obtenido un árbol (figura 20) que, una vez más, confirma la presencia en los individuos infectados de Cp de dos supergrupos de *Wolbachia*, el B y el F, además de corroborar el sistema de detección de éstos mediante una PCR anidada en el gen *16S rRNA*, pues, el diagnóstico de la infección mediante esta técnica coincide con el obtenido mediante las secuencias concatenadas del sistema multilocus.

Esta aproximación nos permite, además, profundizar en la naturaleza de la infección, ya que indica la posible existencia de recombinación entre algunos de los genes estudiados (*coxa*, *fstz*, *fbpa*, *hcpa* y *gatb*) en determinadas poblaciones. Para ello, se repite el procedimiento de análisis estadístico realizado con las secuencias concatenadas del multilocus, pero sólo con uno de los genes del multilocus cada vez y así ver si alguna de las secuencias se asocia con un supergrupo distinto al que lo ha hecho el conjunto de ellas. Los resultados muestran que todos los árboles obtenidos presentan el mismo escenario, sin observarse incoherencias entre la filogenia inferida a partir de las secuencias concatenadas (figura 20), y las obtenidas a partir de las secuencias de los 5 genes del sistema multilocus (apéndices 2 al 6).

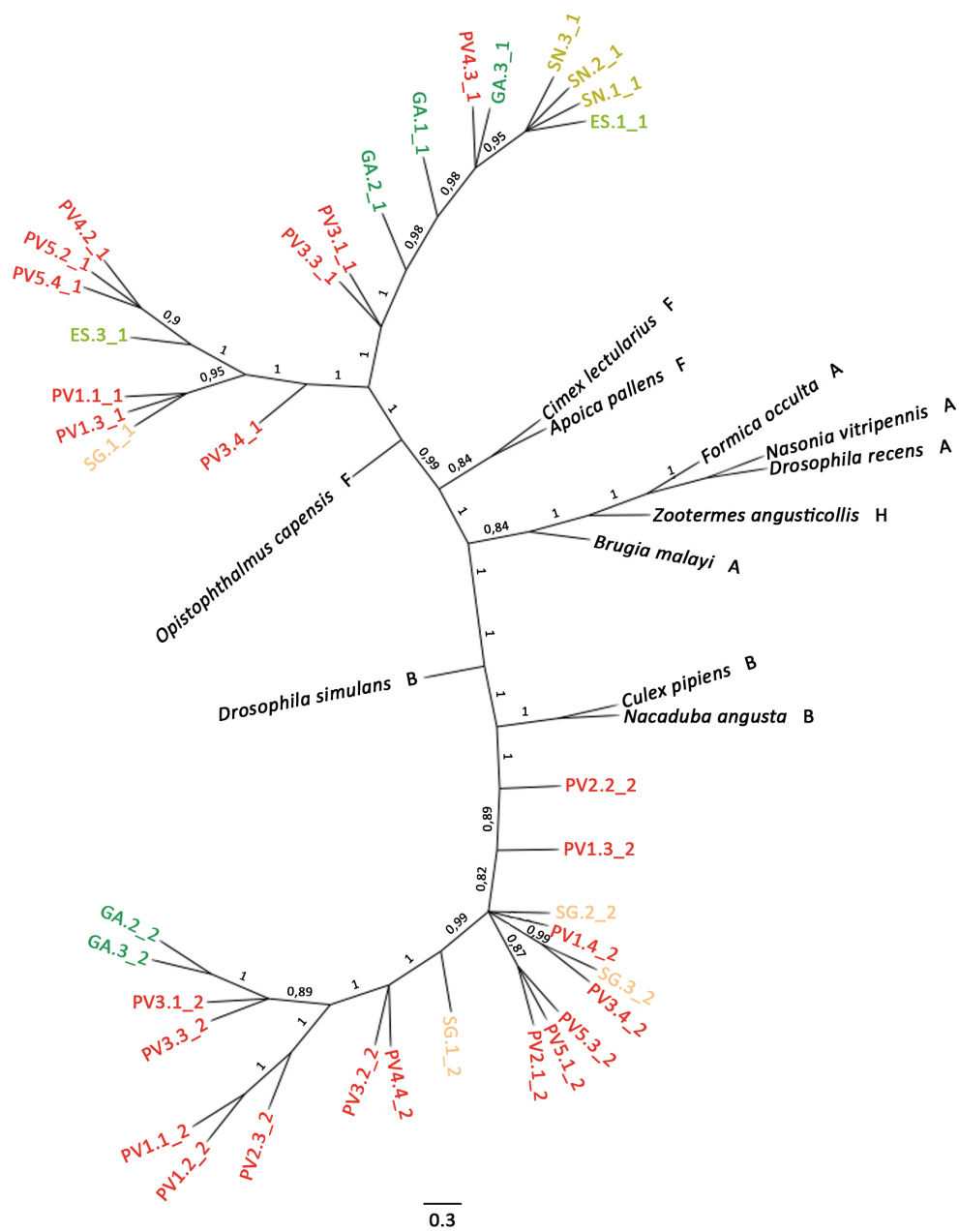


Figura 20. Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana a partir del alineamiento de las secuencias concatenadas de los genes *cox*, *fstz*, *fbpa*, *hcpa* y *gatb*. Las letras al final del nombre de las especies de hospedadores indican el supergrupo de *Wolbachia* al que pertenecen. Las secuencias originales de este trabajo son las que están expresadas mediante un código en el que las letras hacen referencia a la población, y el número al individuo. PV, Puerto Viejo; GA, Gabas; SG, Sallent de Gállego; SN, Sierra Nevada.

Además, Baldo y col. (2006), proponen un método para caracterizar y nombrar las cepas de *Wolbachia* mediante la asignación de un número arbitrario determinado a las secuencias de los 5 genes del multilocus presentes en esa cepa. Esto es, cada secuencia diferente de cada uno de los 5 genes del multilocus se caracteriza con un número. La combinación de estos 5 identificadores, como si de 5 alelos se tratara, representan un ST (del inglés *sequence type*). Cada uno de esos ST caracterizan una cepa. Todas aquellas STs que comparten al menos 3 alelos componen un complejo ST. En nuestro caso, se han identificado 27 STs que se agrupan en 4 complejos (tabla 14). De éstos, 2 pertenecen al supergrupo F y 2 al supergrupo B. El complejo 1 se ha detectado en poblaciones puras de Cpp, de Cpe y en poblaciones híbridas, el complejo 2 se ha detectado a lo largo de todas las poblaciones excepto de las puras de Cpp. El complejo 3 se circunscribe a las poblaciones híbridas y, el 4, a la población de Gabas (Cpp) (figura 21).

Además de estos análisis, se ha realizado un test para detectar recombinación entre los 5 genes que componen el MLST empleado. Los resultados indican posibles eventos de recombinación entre las secuencias *gatB* del supergrupo F y del supergrupo B que son como las de los individuos PV3.3_1 y SG_1.2 (método MaxChi, Smith, 1992, $\chi^2 = 7,73$, $p = 0,03$). También entre las secuencias del gen *hcpA* como las de los individuos, igualmente con infección de supergrupos diferentes, PV3.1_1 (F) y el GA3_2 (B).

Tabla 14 (derecha). Muestras y STs (del inglés secuencia tipo) identificados. A partir del código de cada muestra se puede conocer su procedencia: SN, Sierra Nevada, ES, Escarrilla, SG, Sallent de Gállego, PV, Puerto Viejo con cinco poblaciones diferentes (1 al 5) y GA, Gabas. El número después del primer punto identifica al individuo dentro de esa población, y el último número hace referencia al supergrupo de *Wolbachia* al que pertenece, caracterizado mediante la secuencia del gen *16S rRNA*: 1, F y 2, B. ST, aquellos individuos que tienen la misma secuencia en los 5 loci analizados (*hcpa*, *coxa*, *fbpa*, *ftsZ* y *gatB*) se caracterizan con el mismo ST. Un mismo complejo ST reúne a aquellos individuos que comparten la misma secuencia para tres o más loci.

Muestra	Taxón	<i>hcpa</i>	<i>coxa</i>	<i>fbpa</i>	<i>fts</i>	<i>gatb</i>	ST	Complejos ST	Infección 16S
SN.1.1	Cpe	1	2	1	1	3	1	1	F
SN.2.1	Cpe	1	2	1	1	3	1	1	F
SN.3.1	Cpe	1	2	1	1	3	1	1	F
ES.1.1	Cpe	1	2	1	1	3	1	1	F
ES.3.1	Cpe	3	1	2	2	1	9	2	F
SG.1.1	Cpe	3	3	3	2	1	10	2	F
PV1.1.1	Híbrido	3	3	3	2	1	10	2	F
PV1.3.1	Híbrido	3	3	3	2	1	10	2	F
PV3.3.1	Híbrido	4	4	1	1	5	6	1	F
PV3.1.1	Híbrido	4	6	1	1	4	7	1	F
PV3.4.1	Híbrido	5	5	3	2	1	11	2	F
PV4.3.1	Híbrido	1	9	1	1	5	5	1	F
PV4.2.1	Híbrido	2	1	2	2	1	8	2	F
PV5.2.1	Híbrido	2	1	2	2	1	8	2	F
PV5.4.1	Híbrido	2	1	2	2	1	8	2	F
GA.3.1	Cpp	1	9	1	1	4	2	1	F
GA.1.1	Cpp	1	7	1	1	2	3	1	F
GA.2.1	Cpp	1	6	1	1	3	4	1	F
SG.1.2	Cpe	10	11	12	15	10	13	3	B
SG.2.2	Cpe	10	11	12	12	10	14	3	B
SG.3.2	Cpe	10	11	12	13	10	15	3	B
PV1.4.2	Híbrido	10	11	12	11	10	12	3	B
PV1.2.2	Híbrido	11	11	12	14	13	21	3	B
PV1.1.2	Híbrido	11	11	12	14	13	21	3	B
PV1.3.2	Híbrido	13	11	12	11	10	24	3	B
PV2.3.2	Híbrido	11	11	12	10	14	20	3	B
PV2.2.2	Híbrido	13	11	12	12	11	23	3	B
PV2.1.2	Híbrido	10	11	12	11	15	16	3	B
PV3.4.2	Híbrido	18	11	12	13	15	25	3	B
PV3.1.2	Híbrido	16	11	12	15	13	26	3	B
PV3.3.2	Híbrido	16	11	12	15	13	26	3	B
PV3.2.2	Híbrido	10	11	12	15	13	18	3	B
PV4.4.2	Híbrido	10	11	11	10	14	19	3	B
PV5.3.2	Híbrido	13	11	12	11	15	22	3	B
PV5.1.2	Híbrido	10	11	12	12	15	17	3	B
GA.2.2	Cpp	16	13	11	15	11	27	4	B
GA.3.2	Cpp	16	13	11	15	11	27	4	B

Figura 21 (derecha). Distribución de los complejos ST detectados dentro y fuera de la zona híbrida.



Efectos citogenéticos de *Wolbachia* en *Chorthippus parallelus*

Como se ha explicado en la introducción, varios estudios han indicado que *Wolbachia* tiene la capacidad de producir modificaciones en la citogenética de su huésped. Por esto, uno de los objetivos de este trabajo es examinar algunas características citogenéticas de Cp para ver si pueden presentar relación con la infección por *Wolbachia*. Para resolver esta cuestión se han planteado tres experimentos de los que a continuación se describen los resultados obtenidos, algunos de ellos en colaboración con otros miembros del grupo (ver Sarasa y col., 2012).

Marcadores del cromosoma X de *Chorthippus parallelus* vs *Wolbachia*

El primero de ellos trata de encontrar alguna relación entre el patrón de bandas heterocromáticas y la presencia de un NOR en el cromosoma X de un individuo (analizado mediante impregnación argéntica) y si éste está o no infectado. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 15. No se ha encontrado asociación estadística entre la variable patrón de bandas C y la variable infección (χ^2 con la corrección de Yates = 2.28, g.l. = 5, p = 0.81). Tampoco entre la variable presencia de NOR y la infección (χ^2 con la corrección de Yates = 0.023, g.l. = 1, p = 0.88). Pero sí se han observado algunas tendencias que, si bien pueden ser debidas al bajo número de datos en esas clases, merecen atención. Los individuos con bandas heterocromáticas CE sólo presentan infección por la cepa F. Los individuos caracterizados por presentar bandas CH no presentan infección por la cepa B, a no ser que se encuentre en coinfección. Los individuos con bandeo CEP presentan los cuatro tipos de infección en proporciones semejantes. Y, por último, no se han detectado individuos que presenten infección por B y a su vez tengan un NOR en el cromosoma X.

Tabla 15. Frecuencias absolutas de individuos con cada uno de los patrones de bandeo-C (N = 87) y de individuos con y sin X-NOR (N = 103) para cada tipo de infección.

Tipo de infección	Patrón de bandas C								X-NOR	
	C	CP	CE	CH	CHP	CEP	CEH	CEHP	Presencia	Ausencia
No infectado	2	16	0	2	6	1	0	0	29	1
B	1	5	0	0	1	1	0	0	8	0
F	2	20	1	1	15	1	0	0	49	2
B y F	1	5	0	1	4	1	0	0	14	0
Total	6	46	1	4	26	4	0	0	100	3

Wolbachia y su efecto en la recombinación de *Chorthippus parallelus*

El segundo experimento está dirigido a ver si la infección de *Wolbachia* afecta al número de quiasmas. Este parámetro fue analizado en un total de 97 individuos, 50 saltamontes sin infección y en 47 con infección, de los cuales 30 eran Cpe, 27 Cpp y 40 híbridos. Se estimó el número de quiasmas medio por célula a partir del análisis de 10 células por individuo en las fases de diplotene y diacinesis temprana, de acuerdo con lo descrito por John y Lewis (1983). Los resultados de este análisis, recogidos en la tabla 16, mostraron que no había diferencias significativas en el número de quiasmas medio por célula si se comparaban Cpp con Cpe, o éstos con los híbridos. Sin embargo, sí se han encontrado diferencias significativas en el número de quiasmas medio cuando se comparan los saltamontes infectados ($15,71 \pm 1,21$) con los no infectados ($15,01 \pm 0,93$) (ANOVA de dos factores, factor infección $F = 7,74$, g.l. = 1, $p \leq 0,05$).

Tabla 16. Media y desviación típica del número de quiasmas por célula en individuos puros e híbridos de *Chorthippus parallelus* caracterizados con respecto a la infección por *Wolbachia*. N = 97, 10 células analizadas por individuo, entre paréntesis números de individuo por grupo.

	No infectado	Infectado	Total
Cpe	15.68 ± 0.82 (14)	15.74 ± 0.96 (16)	15.71 ± 0.88 (30)
Cpp	14.60 ± 0.94 (16)	15.80 ± 1.32 (11)	15.20 ± 1.29 (27)
Híbridos	14.94 ± 0.70 (20)	15.49 ± 1.40 (20)	15.17 ± 1.06 (40)
Total	15.01 ± 0.93 (50)	15.71 ± 1.21 (47)	15.35 ± 1.13 (97)

Wolbachia y su efecto en la espermatogénesis de *Chorthippus parallelus*

Y, por el último, el tercer experimento tiene como objetivo examinar si la gametogénesis de Cp puede estar afectada por la infección por *Wolbachia*. Para ello se han contabilizado 1500 espermátidas (figura 22), calculando de esta manera el índice de anomalías morfológicas de dichas espermátidas (IA) en 40 individuos. Estos se clasificaron en cuatro grupos de acuerdo con la presencia o ausencia de infección y según su procedencia de poblaciones híbridas o puras. Como las muestras de estas segundas procedían de diferentes poblaciones, unas caracterizadas como Cpp y otras Cpe, primero se ha realizado un test para ver si el IA difiere entre subespecies, obteniéndose que no existen diferencias significativas ($U = 47,5$, $p = 0,970$). Esto permite trabajar con todos los individuos puros como un único grupo.

Así pues, los IA medios calculados para cada uno de los cuatro grupos establecidos están representados en la figura 23, obteniéndose diferencias significativas entre los cuatro (ANOVA de dos factores: factor infección $F = 1,36$, g.l. = 1, $p \leq 0,05$; factor población $F = 557,17$, g.l. = 1, $p \leq 0,05$; interacción entre factores $F = 79,19$, g.l. = 1, $p \leq 0,05$). Los individuos infectados, tanto híbridos como puros, presentan porcentajes más altos y significativamente diferentes de IA que los individuos no infectados (media ± desviación estandar, 6,09% ± 0,50 y 3,21% ± 0,14 vs, 2,04% ± 0,17 y 0,74% ± 0,13

respectivamente). Si se obvia la variable infección, son los individuos híbridos los que presenta mayores porcentajes de anomalías.

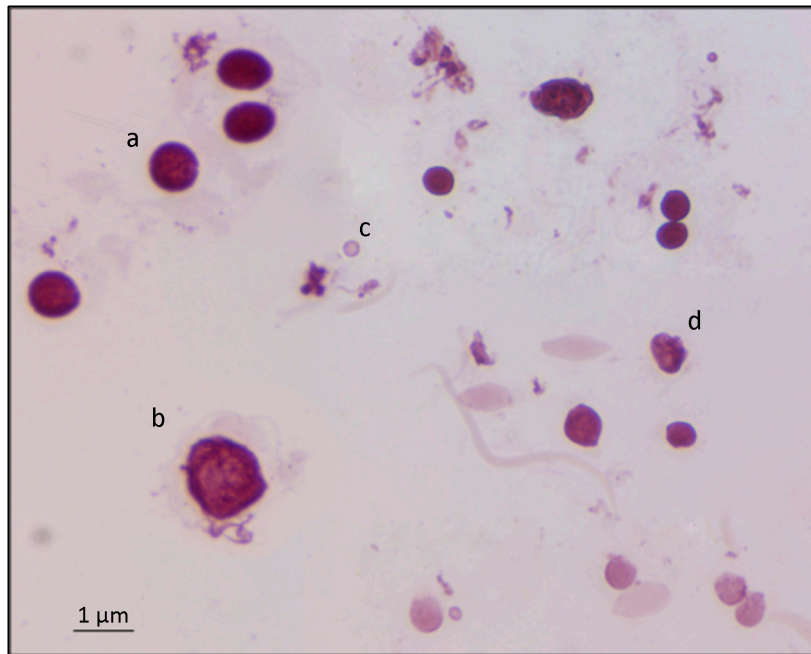


Figura 22. Espermatidas de un individuo de *Chorthippus parallelus* infectado por *Wolbachia* teñidas con orceína acética y visualizadas mediante microscopía de campo claro (40x). a) Espermatida normal; b) Macroespermatida; c) Microespermatida; d) Espermatida amorfa.

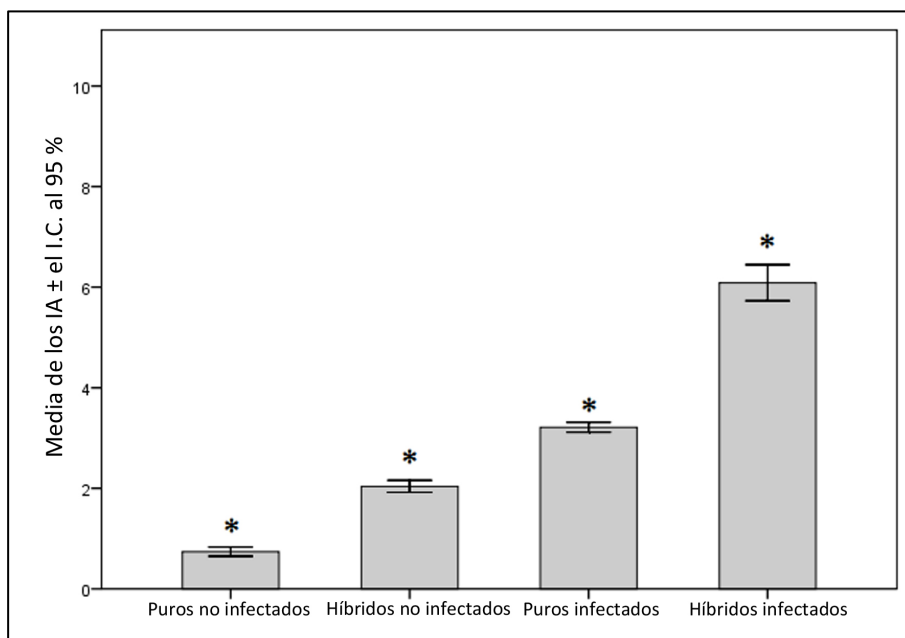


Figura 23. Media de los índices de anomalías (IA) espermáticas encontrados en *Chorthippus parallelus*. N = 10 individuos por grupo. Las barras de error representan el intervalo de confianza (I.C.) al 95%. *Diferencias significativas con el resto de los grupos, $p \leq 0,05$.

DISCUSIÓN

Caracterización de las poblaciones de *Chorthippus parallelus*

El cromosoma X

Uno de los marcadores asociado al cromosoma sexual, estudiado profundamente a lo largo de toda la zona de contacto entre las subespecies Cpe y Cpp, es la presencia de una región organizadora del nucleolo (NOR). Este NOR parecía estar asociado a la banda de heterocromatina distal que presentan los cromosomas X de los individuos de Cpp (Gosálvez y col., 1988; Bella y col., 1993) y así se ha vuelto a confirmar en este trabajo, observándose que aquel individuo que muestra una banda distal heterocromática tiene también cistrones ribosómicos (Serrano, 1994). Existe pues la posibilidad de que haya una relación íntima entre la banda P de Cpp y la presencia de genes ribosomales. Ahora bien, ¿está esa banda heterocromática ligada a la región de ADN_r, o esta región se encuentra integrada en esa banda? Esta segunda opción parece la más plausible, pues, aunque las clinas estudiadas de estos dos marcadores parecen tener diferentes centros y anchuras (Buño y col., 1994), los estudios en los que se han definido éstas han utilizado la técnica de tinción argéntica (Rufas y Gosálvez, 1982) que, lo que realmente revela es si hay o no actividad nucleolar (Miller y col., 1976), esta técnica no permite la detección directa de secuencias ribosomales. De manera que existe la posibilidad de que no se detecte actividad nucleolar a pesar de la presencia de secuencias ribosomales, o viceversa. De hecho, así lo confirmaron Bella y col. en 2007 en un estudio en el que detectaron que algunos cromosomas podían dar falsos positivos para la técnica de tinción argéntica. Éste fue el caso del cromosoma megamérico M6, pues al realizar una FISH con secuencias de ADN ribosómico, no se detectó señal de hibridación. Y, también, existe el ejemplo contrario, Flanagan y col. (1999) observaron mediante FISH individuos

con cistrones ribosómicos en el X que no mostraban positivos para la tinción argéntica. Además, los trabajos en los que se describe la naturaleza química de la heterocromatina de Cp han mostraron que la composición de la banda P difería de las del resto (Bella y col., 1993), presentándose rica en G + C, un rasgo detectado en otros organismos con bandas heterocromáticas correspondientes a secuencias ribosomales (Volpi y col., 1992; García y col., 2009).

El otro marcador citogenético asociado al cromosoma X es el patrón de bandas C. Las poblaciones estudiadas en el presente trabajo se ubican en una zona de unión del puerto Viejo de Sallent, entre el valle de Tena (España) y el de Ossau (Francia), donde nunca antes se había analizado todas las bandas de este marcador. El objetivo es recabar más datos en torno a esta región de contacto en la que se habían detectado varias características en el comportamiento de estos marcadores muy reseñables (Serrano y col., 1996). Por un lado, se había observado la presencia de una nueva banda heterocromática no detectada antes en estos mismos valles (Ferris y col., 1993) ni en otros contiguos (Buño y col., 1994) y, por otro, unas clinas de las bandas P y E muy diferentes, tanto en su anchura como en la posición de su centro (Serrano y col., 1996) (figura 3).

En las poblaciones de Cp estudiadas en el puerto Viejo de Sallent se han identificado las mismas bandas heterocromáticas ya detectadas en este taxón en la misma zona de contacto, la banda P, la E y la H (Gosálvez y col., 1988; Serrano y col., 1996). Con una presencia de la banda P por encima del 65% en todas las poblaciones estudiadas y cercana al 100% en la más septentrional (PV5) se apunta a un gradiente de este marcador similar al obtenido por Serrano y col. (1996), con una gran introgresión en la zona híbrida. Aunque con una tendencia más suavizada, pudiendo indicar que la recolonización de las poblaciones del puerto Viejo fuera más tardía. También se han detectado resultados acordes con los descritos por Serrano y col. (1996) para la banda E. Si bien la presencia media de este rasgo es del 28%, las dos poblaciones más al norte (PV5 y PV4) muestran un descenso de este valor, 11% y 7%, respectivamente. Una vez

más, son valores similares a los detectados por Serrano y col. en poblaciones que distan lo mismo, tomando como referencia Escarrilla.

Así pues estos datos indican que las dinámicas de la banda P y E en el puerto de Portalet y el Viejo de Sallent son similares y acordes con la idea de la introgresión de estos marcadores asociados con la llegada de los taxones que los portan, Cpp con la banda P y Cpe con la E. Sin embargo, respecto a la banda H los resultados son muy distintos. Las frecuencias aquí obtenidas (del 0% al 6%) distan mucho de las detectadas en las poblaciones circundantes a Portalet (del 29% al 100%). Este hecho puede dar una idea de que la banda H, un “alelo raro” solo identificado en estos valles dentro de la zona híbrida de Pirineos, podría haber surgido en alguna población del corredor de Portalet, posiblemente en la vertiente Francesa, y desde allí dispersarse hacia las dos vertientes y el paso del puerto Viejo de Sallent. Si bien, esto hay que tomarlo con cuidado y un incremento tanto del tamaño muestral, como del número de las poblaciones, podría ayudar a dilucidar esta hipótesis.

En el presente trabajo se ha encontrado que las clinas presentan ciertas fluctuaciones, al igual que le sucedió a Serrano y col. (1996). En su estudio, los autores observaron que poblaciones que observaron que poblaciones próximas, presentaban también grandes variaciones en las frecuencias de estos marcadores. Por ejemplo, dos poblaciones a tan solo unos cientos de metros de distancia presentaban una variación de 89 puntos porcentuales (de 100% al 11%) en la presencia de la banda H. Si bien este caso en concreto podría explicarse por ser esta banda un “alelo raro” de la zona de contacto, estas fluctuaciones se pueden observar entre otras poblaciones y otras bandas como es el caso de otros trabajos realizados en el mismo valle (Ferris y col., 1993), donde se han observado descensos de la banda P del 100% al 60%, para volver a ascender a frecuencias del 100%, bajando a continuación al 27%. Todo esto en poblaciones que distan entre ellas menos de 5 Km. Estos patrones se han descrito también en la clina correspondiente al NOR asociado al cromosoma X (Gosálvez y col., 1988). Este tipo de disposición, como en islas, puede ser reflejo de una distribución desigual como efecto de la baja dispersión de este organismo (Virdee y Hewitt, 1994) y de que los lugares de

captura no correspondan a poblaciones propiamente dichas. De todas formas, este problema dependerá mucho de la orografía.

La relación entre las subespecies de Cp y el patrón de las bandas heterocromáticas del cromosoma X es evidente y esto sirve para inferir el origen de las diferentes poblaciones a gran escala (Bella y col., 2007), dibujar clinas dentro de la zona híbrida y caracterizar poblaciones a grandes rasgos en puras e híbridas (Ferris y col., 1993; Buño y col., 1994; Serrano y col., 1996). Pero no permite, por ejemplo, la caracterización de un individuo concreto dentro de una población. Por esto y para complementar los datos que se han obtenido en este trabajo y en otros previos con los marcadores citogenéticos se ha recurrido al uso de microsatélites.

Los microsatélites

El estudio de los microsatélites elegidos en poblaciones puras e híbridas de *Chorthippus parallelus* nos ha indicado ciertos rasgos del estado, a nivel genético, de dichas poblaciones. A destacar la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg, la falta de heterocigotos observados y sobre todo, la existencia de una estructuración genética de estas poblaciones, confirmada por los valores de F_{st} y por un análisis bioinformático con el programa STRUCTURE.

El hecho de que las poblaciones estudiadas se encuentren desviadas del equilibrio de Hardy-Weinberg como resultado de un defecto de heterocigotos puede ser consecuencia de la actuación independiente o combinada de algunos factores: presencia de algún proceso selectivo, efecto fundador, deriva génica, desviaciones de la panmixia o presencia de alelos nulos. Esta última podría conllevar un error de medición que puede afectar a los estimadores poblacionales obtenidos.

La presencia de alelos nulos ha sido observada anteriormente, con los marcadores utilizados en este trabajo, en poblaciones de Alemania (Wiesner y col., 2011). En nuestro caso, este hecho no se plantea como un problema pues se dispone de siete loci con alta variabilidad que permiten una adecuada evaluación genética de las poblaciones (Abercrombie y col., 2009). Además, parece que la presencia de alelos nulos es algo común en los saltamontes (Contreras-Díaz y col., 2006; Zhang y col., 2009) pues parece estar asociado a organismos con genomas de gran tamaño (Garner, 2002) como es el caso de los ortópteros. Se han descrito, de hecho, en una especie del mismo género, *Chorthippus biguttulus* (Ustinova y col., 2006). Algunos autores han propuesto que estos alelos nulos son consecuencia de las altas tasas de mutación en las regiones que flanquean los microsátélites, no sólo en ortópteros (Chapuis y col., 2008; Blanchet y col., 2010), sino también en otros organismos (Kodandaramaiah y col., 2011). Esto se ha considerado en algunos casos un problema que puede afectar a la estimación del estadístico F_{st} (Van Oosterhout y col., 2006; Chapuis y Estoup, 2007). Sin embargo, no siempre es posible trabajar sin alelos nulos, pues en algunos organismos están muy presentes (Garner, 2002).

Además, plantearse hacer el análisis sin considerar los alelos nulos puede conllevar una reducción de los datos por descarte de un gran número de individuos que puede afectar todavía más al cálculo de los estimadores poblacionales. Actualmente existen técnicas estadísticas, como por ejemplo la corrección ENA (Chapuis y Estoup, 2007; Chapuis y col., 2008), que permiten valorar cuánto se desvían las F_{st} observadas de las esperadas. En este estudio, los valores de F_{st} entre poblaciones, con y sin la corrección ENA, no difieren en más de 0,01, confirmando que el efecto de los alelos nulos en estimación de los estadísticos poblacionales es mínimo. Los valores de F_{st} con y sin la corrección ENA son relativamente similares e iguales o menores de 0,1, es decir, la diferenciación genética entre poblaciones, en ambos casos se considera de moderada a baja.

Esto indica que los resultados obtenidos no están muy afectados por la presencia de alelos nulos. Además, un estudio realizado por Carlsson (2008), dónde se simulaba el efecto de la presencia de alelos nulos mostró que, éstos, producían pequeñas

sobrestimaciones de F_{st} , menores de 0,005. El autor concluye que la presencia de alelos nulos no debería afectar mucho a las conclusiones relacionadas con la presencia o ausencia de diferenciación genética. Además, también verifica que la presencia de estos alelos reduce sólo ligeramente la proporción de individuos asignados a los diferentes *clústeres* en el programa STRUCTURE (Evanno y col., 2005). En definitiva, el efecto de estos alelos nulos es bajo y las estimaciones de F_{st} con loci que presentan este tipo de alelos son más robustas de lo que se había pensado hasta ahora, una idea que apoyan también otros trabajos (Kodandaramaiah y col., 2011) siempre que se use un buen número de marcadores altamente polimórficos (Wiesner y col., 2011).

Así pues, parece plausible plantearse una hipótesis alternativa a la de los alelos nulos para explicar el déficit de heterocigotos. De las nombradas al inicio del apartado, el efecto fundador y deriva génica, se plantean *a priori* más difíciles de justificar por las características de las poblaciones estudiadas. Todas las poblaciones, tanto las caracterizadas como puras, para una subespecie u otra, como las caracterizadas como híbridas, presentan déficit de heterocigotos para muchos de los marcadores estudiados.

De esta manera, el efecto fundador y la deriva génica podrían ser una explicación para las poblaciones puras, pero no para las híbridas. Estas poblaciones están constituidas por individuos descendientes de la hibridación de dos taxones distintos (Butlin y Hewitt, 1985a; Butlin y Hewitt, 1985b). Esta idea parece, pues, contraria al modelo del efecto fundador. Además la migración, detectada en forma de introgresión en este estudio, debería también amortiguar, en caso de que la hubiera, la deriva génica. Así pues, o bien la selección o la ausencia de panmixia, se presentan como las opciones más factibles, a la luz de los datos obtenidos en este estudio y en otros previos.

Que los cruzamientos no se dieran al azar sería una posibilidad muy plausible teniendo en cuenta que las poblaciones analizadas se encuentran en una zona híbrida formada por dos subespecies de saltamontes que presentan, además de diferencias morfológicas (Butlin y Hewitt, 1985b), diferencias en el comportamiento, incluyendo el canto (Butlin y Hewitt, 1985a). De hecho, en condiciones de laboratorio, se ha comprobado que hay

una selección positiva en los cruzamientos, es decir, las hembras, que son las que eligen en este organismo, prefieren cruzarse con machos de su misma subespecie (Ritchie y col., 1989). Pero también en las poblaciones híbridas, en condiciones naturales, se han detectado apareamientos selectivos (Butlin y Ritchie, 1991). Es más, se ha podido observar que el método de selección de machos que usan las hembras de una y otra subespecie son diferentes. Se ha postulado que en las hembras de Cpp el canto juega un papel importante, incluso posiblemente selectivo, en la elección del macho. Sin embargo, en las hembras de Cpe el canto parece irrelevante y recurren a otros sistemas de selección, como pueden ser las feromonas y/o el estímulo táctil (Ritchie, 1990). Estas observaciones, junto con los niveles de Fis detectados en el presente estudio, dan fuerza a la idea de que la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg detectada pueda ser debida, entre otros factores, a la ausencia de panmixia. Si bien, como se ha comentado antes, también la selección puede estar, junto con la elección en los cruzamientos, produciendo dicha desviación.

Es difícil apuntar qué fuerza o fuerzas selectivas están actuando, pero está aceptado que las zonas híbridas son regiones de tensión (Key, 1968; Barton y Hewitt, 1985) donde existe un equilibrio entre la migración de individuos puros y la selección contra los híbridos. En el caso de la zona en estudio hay varios datos que apoyarían esta idea. Uno de ellos es el hecho de que aunque, en la naturaleza, Cpe y Cpp hayan dado descendientes híbridos, los cruzamientos en el laboratorio entre individuos puros han mostrado que los machos F1 son estériles (Hewitt y col., 1987; Bella y col., 1990). Estos resultados han sido extendidos a descendientes de cruzamientos entre individuos de poblaciones híbridas, que, aunque fértiles, pueden presentar diferente grado de disfunción de las gónadas según si los parentales provienen de poblaciones cercanas o más lejanas entre sí o de la zona centro o de los extremos de la zona híbrida (Virdee y Hewitt, 1994; Shuker y col., 2005a). Además, de nuevo en el laboratorio, se han detectado que cruzamientos secuenciales entre Cpp y Cpe dan como resultado homogamia asimétrica (Bella y col., 1992) explicada o por una fecundación preferencial por el esperma homogamético o por una mayor mortandad de los embriones híbridos.

Todos estos datos apoyan la idea de que hay fuerzas selectivas operando en las poblaciones en estudio. Algo que ya apuntaron Serrano y col. (1996) al observar que un marcador citogenético presentaba una clina muy estrecha. En cualquier caso parece que hay algún factor, que afecta a la dinámica y estructura de los marcadores poblacionales estudiados; éstos pueden ser factores genómicos o citoplasmáticos intrínsecos a Cp o un factor extrínseco como la presencia de *Wolbachia* en las poblaciones estudiadas, lo cual será discutido más adelante.

La dispersión de estos saltamontes está descrita en 30 metros por individuo y generación (Virdee y Hewitt, 1992), lo cual podría implicar que las poblaciones se estructuraran fácil e intensamente. Sin embargo, se ha observado una diferenciación genética entre poblaciones moderada, pues las F_{st} detectadas han sido inferiores a 0,1. Además, hay otros dos estudios donde se han usado los mismos loci para caracterizar poblaciones de Cp de Alemania (Wiesner y col., 2011) y de la península de Anatolia (Korkmaz, 2010) y sus resultados son similares a los observados en este trabajo. Son las poblaciones turcas las que presentan mayores F_{st} , con valores por encima del 0,5, eso sí, en poblaciones que distan más de 700 Km, porque también las hay que presentan unos F_{st} próximos a 0 (0,002) y distan entre ellas más que lo que lo hacen las de este trabajo.

Las poblaciones alemanas tienen valores más homogéneos, entre 0 y 0,04, pero también la distribución geográfica de éstas es más reducida, con las poblaciones más distantes a unos 200 Km. Estos datos nos muestran por un lado que, a pesar de su baja dispersión, en general existe bastante flujo génico entre poblaciones. Y por otro que, comparando lo obtenido en este trabajo con los realizados en poblaciones de Alemania y Turquía, se podría decir que es bastante reseñable que las poblaciones internas del transecto estudiado no presentan F_{st} mayores de 0,03 entre ellas, pero todas tienen una F_{st} por encima del 0,07 con respecto a las dos poblaciones de los extremos (Escarrilla y Gabas) y todo en apenas 30 Km. Este hecho unido a los resultados obtenidos con el programa STRUCTURE que clasifica todos los individuos analizados en tres *clústeres* o poblaciones, permite concluir que las 5 poblaciones estudiadas están estructuradas genéticamente

en 3: Escarrilla, Gabas, y las tres del Puerto Viejo de Sallent. Estos datos concuerdan con las clinas descritas por Ferris y col. (1993) y Serrano y col. (1996), pues los marcadores que ellos estudiaron, el X-NOR y las bandas heterocromáticas en el X respectivamente, se encontraban fijados en Gabas y Escarrilla. De hecho, las poblaciones que se encuentran de Gabas hacia el norte y de Escarrilla hacia el sur ya habían sido consideradas como puras (Butlin y col., 1991).

El análisis de los marcadores microsatélites aquí presentado permite profundizar un poco más en la genética de estas poblaciones, pues aparte de darnos una idea de su estructura, también nos habla de su posible origen y del *background* genético de los individuos que la componen. De esta manera, aunque la estructura genética global aquí presentada y los estudios previos citados anteriormente hablan de que las poblaciones de Escarrilla y de Gabas son poblaciones puras de Cpe y Cpp, respectivamente, si el análisis se hace a nivel de individuo se pueden sacar más conclusiones. De hecho, se han detectado en dichas poblaciones de manera casi testimonial individuos cuyos genotipos son potencialmente compatibles con que sus parentales provinieran de poblaciones híbridas o de la otra subespecie. Esto tampoco parece tener mayores implicaciones, pues se está hablando de dos subespecies de una misma especie, y no de dos especies distintas. Es lógico, pues, que compartan rasgos y alelos y además no estamos seguros de que estemos trabajando con marcadores completamente específicos de un taxón u otro: no disponemos de datos suficientes de otras poblaciones puras, que nos permitan cuantificar la posible existencia de un polimorfismo de muy baja frecuencia para alguno de los marcadores considerados como subespecie-específicos. Pero sí hay un dato digno de discutir, por lo llamativo que es. En la población de Escarrilla se ha observado un individuo que *a priori* muestra una alta probabilidad de proceder de una población ancestral común a los individuos de Gabas. Dado que parece poco probable que Escarrilla no sea pura para Cpe, por lo observado aquí y en estudios previos (Butlin y col., 1991; Ferris y col., 1993; Vázquez y col., 1994; Serrano y col., 1996), asumimos que este resultado pueda ser debido a una contaminación.

Todo esto lleva a plantear una cuestión no abordada anteriormente, ¿nos encontramos ante una zona híbrida unimodal o bimodal (Harrison y Bogdanowicz, 1997)? Las primeras están definidas como aquellas que presentan un alto número de individuos híbridos, es decir, con características de los dos taxones involucrados en dicha zona. Las segundas, por otro lado, serían aquellas donde el número de híbridos es reducido y en las poblaciones predominan individuos con características similares a los parentales puros. Pero este tipo de clasificación no puede ser abordada si no es con el uso de datos genotípicos de varios loci (Jiggins y Mallet, 2000).

En este estudio, el análisis de los siete microsatélites examinados ha permitido definir la zona híbrida de Cp como unimodal, donde las poblaciones del transecto están constituidas por individuos con combinaciones genotípicas híbridas distintas de las puras, con una elevada presencia de nuevas combinaciones de alelos, algo típico en las zonas de contacto (Barton y Hewitt, 1985; Serrano y col., 1996; Schilthuizen y col., 2001; Steinmetz y col., 2004). Además, en las zonas unimodales se ha detectado la presencia de introgresión, poca selección contra los híbridos y, sobre todo, poco aislamiento reproductivo precigótico (Arias y col., 2008; Gay y col., 2008; Gompert y col., 2010), características detectadas en el sistema en estudio (Shuker y col., 2005a).

El uso de los microsatelites se ha mostrado, en este estudio preliminar, como una herramienta muy interesante para el análisis de las poblaciones de Cp en la zona híbrida de Pirineos, por lo que sería interesante ampliar dicho estudio a lo largo de toda la zona de contacto e incluso en poblaciones exteriores que sirvieran de referencia.

Caracterización de la infección por *Wolbachia* en la zona híbrida de *Chorthippus parallelus*

Caracterización de los supergrupos

Los análisis filogenéticos a partir de secuencias del gen *16S rRNA* y *wsp* (árboles de las figuras 16 y 17) indican que los individuos de Cp analizados en este estudio presentan cepas pertenecientes a dos supergrupos de *Wolbachia*, B y F. El primero de ellos ha sido descrito exclusivamente en artrópodos (Lo y col., 2002) pero en diversos órdenes (Werren y col., 1995), incluso en ortópteros, apuntando a ser el responsable de cruzamientos incompatibles entre dos especies de grillos que forman una zona híbrida en América del Norte (Giordano y col., 1997). Las cepas de *Wolbachia* pertenecientes al supergrupo B se han asociado en varias ocasiones a fenotipos como la incompatibilidad citoplasmática (Machtelinckx y col., 2009) aunque no todas ellas lo presentan y hay que tener cautela a la hora de definir el fenotipo de la cepa identificada (Mandel y col., 2001; Maroja y col., 2008).

El otro supergrupo identificado, el F, fue descrito inicialmente como exclusivo de nematodos pero, estudios posteriores han señalado la presencia de este supergrupo en otros organismos. De hecho, todo apunta a que sea el supergrupo más variable y con mayor dispersión de todos (Casiraghi y col., 2005). Éste, al igual que el supergrupo B, ya ha sido también descrito en varias especies de ortópteros (Panaram y Marshall, 2007) incluido Cp (Martínez y col., 2009; Bella y col., 2010; Zabal-Aguirre y col., 2010). Este es, sin embargo, el primer trabajo que identifica la presencia de cepas de *Wolbachia* B y F en todas las poblaciones del puerto Viejo de Sallent (figuras 16 y 17).

Aunque en general consistentes, los resultados obtenidos en el árbol realizado mediante las secuencias del gen *wsp* presentan alguna discordancia, aparece una secuencia

perteneciente al supergrupo B en el clado del supergrupo A. Esta incoherencia puede ser debida a la alta recombinación y selección diversificadora que se ha detectado en dicho gen (Werren y Bartos, 2001; Baldo y col., 2002; Jiggins y col., 2002; Baldo y col., 2005). De hecho, esto hace que el uso de este gen solo no permita una caracterización realista de las cepas (Baldo y col., 2006). Por esto, en este estudio se ha combinado con el análisis del gen *16S rRNA* y un sistema multilocus que permite caracterizar las cepas con mayor resolución.

Caracterización de la incidencia de infección por *Wolbachia* en las poblaciones de *Chorthippus parallelus*

La posibilidad de discriminar entre supergrupos mediante PCR ha ofrecido gran cantidad de datos que permiten valorar la incidencia de la infección en las poblaciones de la zona híbrida de Cp. Algunas de éstas ya habían sido caracterizadas con anterioridad y a lo largo de diferentes años por Zabal-Aguirre y colaboradores (2010). Éstos no observaron un patrón temporal definido, pues todas las poblaciones estudiadas presentaban diferencias interanuales significativas sin mostrar una tendencia clara. Tampoco observaron diferencias en la incidencia de la infección entre sexos. Algo que podría esperarse en un sistema donde *Wolbachia* estuviera produciendo feminización o muerte selectiva de machos o partenogénesis. Sin embargo, sí que observaron un patrón espacial, o mejor dicho, tres patrones geográficos de infección. Uno típico de las poblaciones ibéricas puras, caracterizado por alta tasa de infección por el supergrupo F; otro propio de las poblaciones híbridas (con excepción de la población de Sallent de Gállego) y europeas, caracterizado por un bajo índice de infección y predominantemente de B y, por último, un patrón exclusivo de la población de Sallent de Gállego, caracterizado por un alto nivel de individuos coinfectados.

Esto se asemeja a los resultados obtenidos en este trabajo; aunque aquí no ha sido posible apoyarlo estadísticamente, sí que se han obtenido tendencias similares. La

población de Sierra Nevada analizada tiene un alto índice de infección por F (más del 90%) y Sallent de Gállego se ha identificado como la población con el mayor índice de coinfectados (41% siendo la media de un 14%). En cualquier caso, uno de los objetivos de este trabajo era caracterizar el patrón de infección para 5 nuevas poblaciones de la zona híbrida ubicadas en una zona de paso nunca antes examinada y así poder detectar nuevos patrones de infección que den una idea de la dinámica de la infección por *Wolbachia* en Cp para, en última instancia, poderlo comparar con el transecto de Portalet. Nuestro estudio corrobora el patrón esperado por la disposición geográfica de estas poblaciones, patrón norte, asemejándose al de otras poblaciones de la zona híbrida, y confirmando una distribución espacial de la infección. Esta distribución podría explicarse bajo otras situaciones, teniendo en cuenta que se ha detectado que *Wolbachia* produce IC unidireccional (hembra sin infección con macho infectado) y, posiblemente aunque en menor media, bidireccional (hembra infectada por una cepa con macho infectado por otra cepa distinta) (Zabal-Aguirre, com. pers. y Bella y col. 2010). Además, en este estudio también remarcamos, más adelante, que la bacteria tiene efectos citogenéticos en Cp (Sarasa y col., 2012).

Existen diferentes escenarios que podrían explicar la distribución que se observa dependiendo de si la infección se hubiera dado antes o después del aislamiento de estas poblaciones en el cuaternario (Hewitt, 2011) y/o qué cepas hubieran infectado primero. Además, hay que tener en cuenta que en algún organismo se han detectado pérdidas y ganancias sucesivas de la infección (Frost y col., 2010). Con estas variables, la idea de una infección ancestral, posterior al aislamiento de las poblaciones pero anterior al contacto secundario que originó la zona híbrida, parece muy interesante. Pues, al contactar las poblaciones de Cpp y Cpe, además de aparecer barreras atribuibles al conflicto entre los genomas de los saltamontes, también las habría debidas a *Wolbachia*. Se estaría ante una situación en la que los diferentes supergrupos de *Wolbachia* hubieran infectado diferentes poblaciones refugio, cepas B poblaciones de los Balcanes y F de la Península Ibérica, expandiéndose de manera conjunta. Aunque el hecho de que todas las poblaciones de Cp tengan infección por ambos tipos de *Wolbachia* (en diferentes proporciones) apunta a que otras variables está actuando. Una puede ser la

transmisión horizontal, que había sido infravalorada en esta bacteria (Baldo y col., 2008), o variables ambientales que afecten al estado de la infección y sus efectos en el hospedador (Mouton y col., 2007). Por otro lado, estudios realizados por otros miembros del grupo con poblaciones más distantes de la zona híbrida apuntan a que las poblaciones de Cp están infectadas fundamentalmente por dos cepas distintas del supergrupo F, una afectando a las poblaciones ibéricas y la otra a las poblaciones europeas, y dos muy similares del B (Paloma Martínez, comunicación personal), lo que apunta a, al menos, tres focos distintos de infección.

En cualquier caso, la IC detectada en Cp (Bella y col., 2010) postula a *Wolbachia* como un agente a tener en cuenta en la zona híbrida, pudiendo, o bien reforzar las barreras reproductivas o, bien, suavizarlas.

Caracterización de las cepas de *Wolbachia* mediante un sistema multilocus

Aunque el abaratamiento de la secuenciación a gran escala apunta a que los estudios de epidemiología se realizarán mediante secuenciación genómica, hasta la fecha el sistema más extendido para caracterizar cepas y líneas de microorganismos procarióticos son los sistemas multilocus (MLST) (Maiden y col., 1998). Utilizados inicialmente en trabajos con fines fundamentalmente médicos, cuyos objetivos eran identificar el origen de focos de infección o como método para caracterizar patógenos virulentos con cepas resistentes a antibióticos (Sá-Leão y col., 2001; Brueggemann y col., 2003), su uso se ha extendido a otros campos. El empleo de sistemas MLST en el estudio de las relaciones evolutivas de bacterias del mismo género ha sido bien acogido (Jolley y col., 2000; Godoy y col., 2003) y extendido a multitud de taxones, publicándose en 2006 el primer sistema MLST para *Wolbachia* por Baldo y col. Hasta ese momento la mayoría de los trabajos en este género se basaban en filogenias realizadas con el gen *16S rRNA*, con el *wsp* o el *ftsZ* entre otros. Esto limitaba un poco el análisis, pues podía llevar a errores en la interpretación de los resultados por efecto de eventos de recombinación o de

transferencia horizontal no detectados. Además, al no haber un sistema generalizado, era difícil comparar resultados propios con los de otros trabajos. Desde la publicación de este sistema su uso ha sido muy extendido en *Wolbachia*. Se ha utilizado para confirmar o refutar conclusiones previas realizadas con el análisis de otros genes (Baldo y Werren, 2007), sobre el curso de la poco estudiada transmisión horizontal de esta bacteria (Baldo y col., 2008; Raychoudhury y col., 2009; Stahlhut y col., 2010) o el estatus de la infección en amplios grupos de huéspedes (Frost y col., 2010; Augustinos y col., 2011). Por todo esto, en este trabajo se ha recurrido también al sistema MLST diseñado por Baldo y col. (2006) para contrastar, por un lado, los resultados obtenidos con los genes *16S rRNA* y *wsp* y, por otro, para tener un análisis más profundo de este endosimbionte en Cp y su zona híbrida en el valle de Tena y de Ossau.

Así pues, mediante este sistema, se han podido detectar hasta 24 STs diferentes, 11 pertenecientes al supergrupo F y 16 al supergrupo B. Aunque este segundo aparece como más polimórfico, los 16 STs se distribuyen en dos complejos ST (ver resultados), al igual que ocurre con los pertenecientes al supergrupo F. Esto muestra una variabilidad de cepas nunca antes descrita en un único hospedador mediante este sistema. Se habían observado anteriormente altos niveles de diversidad de *Wolbachia*, pero dentro de un grupo de taxones (Salunke y col., 2012). En muchos trabajos se ha descrito, incluso, el mismo ST en taxones diferentes (Baldo y col., 2007). Además los genes seleccionados para el sistema multilocus, entre otras características, presentaban una evidencia de fuerte selección estabilizadora (Baldo y col., 2006) determinada por una relación Ka/Ks muy inferior a 1. Esto implica que el número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo (Ka) es menor que el número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo (Ks). Esta situación abre un gran interrogante, ¿por qué la infección por *Wolbachia* en *Chorthippus parallelus* se presenta tan diversa, al menos, a nivel nucleotídico?

Hay varias hipótesis que pueden explicar esta situación, la primera es simplemente metodológica. El hecho de que un único cambio nucleotídico en la secuencia de uno de los genes sea un alelo en concreto parece lógico, pues un alelo es sencillamente una

alternativa de un gen, independientemente de que conlleve un cambio fenotípico. Pero tal vez haya que tener cuidado y no considerar como cepas diferentes a dos clones que presenten un único alelo distinto. Parece más realista usar el concepto de complejo ST o clonal, como ya apuntaban Urwin y Maiden (2003), para clasificar líneas bacterianas. Esto es porque es difícil saber si la diferencia entre dos secuencias es debida a una nueva mutación o a recombinación entre dos líneas bacterianas del mismo linaje (Enright y Spratt, 1999). De hecho, la recombinación podría ser una de las explicaciones de la gran diversidad observada, pues se han detectado posibles eventos de este tipo entre distintos genes.

En cualquier caso, no hay modelo descrito hasta la fecha en el que se haya detectado este alto nivel de diversidad de cepas de *Wolbachia* mediante este sistema. Esta variabilidad podría, además, estar modulada por la posibilidad de que nuestras observaciones reflejen variaciones intrínsecas a nuestro propio modelo. La variabilidad de secuencias estudiadas no es igual a lo largo de todas las poblaciones analizadas. Aunque el número de secuencias examinadas por población no es muy grande, se podría esperar que éstas se diferenciaron más según su distribución geográfica, pero esto no se observa. Mientras en Sierra Nevada todas las secuencias analizadas pertenecen al mismo supergrupo y al mismo ST, en la zona híbrida hay dos supergrupos, 4 STs complex y 27 STs distintas. Esto plantea la cuestión de si tanta variabilidad podría estar producida por el contacto de varios focos de infección. Esta idea se vería apoyada tanto por los eventos de recombinación identificados entre cepas de distintos supergrupos distribuidas en la zona híbrida, como por el hecho de que algunas secuencias presentan, en contra de lo esperado, valores de K_a/K_s por encima de 1, señalando que algunas secuencias podrían haber divergido por selección positiva. En cualquier caso, un estudio más extenso, sobre todo con más individuos y poblaciones de fuera de la zona híbrida, se tendría que llevar a cabo para poder discutir más en esta dirección.

Efectos citogenéticos de *Wolbachia* en *Chorthippus parallelus*

Parte de los experimentos realizados en este trabajo iban dirigidos a responder si puede haber algún efecto o relación entre la infección por *Wolbachia* y ciertos rasgos citogenéticos de su huésped. Más concretamente si el tipo de infección puede estar relacionada, por un lado, con la transmisión de un carácter nuclear, como es la heterocromatina del cromosoma X y el NOR asociado a éste y, si la infección, puede afectar a ciertos rasgos relacionados con la espermatogénesis y la meiosis masculina.

Marcadores del cromosoma X de *Chorthippus parallelus* vs *Wolbachia*

Tras el análisis estadístico no se ha podido encontrar ninguna correlación entre los marcadores de heterocromatina del cromosoma X y el tipo de infección por *Wolbachia* a nivel individual. Es más, incluso los individuos con bandeo CEP (recombinantes para las bandas características de cada subespecie) presentan los cuatro tipos de infección en proporciones semejantes. Tampoco se ha visto ninguna relación significativa entre la infección y la presencia de un NOR en el cromosoma sexual. Las hipótesis de partida eran dos. Por un lado el hecho de que se hayan detectado patrones de infección asociados al carácter puro o híbrido de Cp hacía pensar que tal vez hubiera, además de una correlación por poblaciones con la infección, también una correlación por individuos relacionada con la presencia de un tipo concreto de cromosoma sexual. Por el otro lado, podría ser que alguna de las bandas heterocromáticas del X, o las secuencias ribosómicas, actuaran como carácter testigo y estuvieran ligadas a genes, por ejemplo del sistema inmune, que de alguna manera hicieran a un individuo más o menos susceptible a la infección.

Los resultados obtenidos pueden ser debidos al bajo número de muestras en algunos de los grupos, por ejemplo sólo 3 individuos de 103 no mostraron un NOR asociado al X. De hecho, se han observado tendencias que si bien no permiten plantear demasiadas hipótesis, invitan a ampliar el estudio, pues se ha visto que *Wolbachia* tiene efectos en la reproducción y espermatogénesis de Cp (Bella y col., 2010; Sarasa y col., 2012) y, además, hay evidencias de transmisión horizontal de genes de la bacteria a este hospedador (Sarasa, 2009; Bordenstein, comunicación personal)

De todas formas, teniendo en cuenta, además, que en trabajos previos se ha visto a la bacteria en el citoplasma (Martínez y col., 2009) y los rasgos estudiados son nucleares, podría ser interesante plantear, además de este experimento, otro similar, pero con un marcador citoplasmático, como el estudio de alguna secuencia mitocondrial. Estas secuencias ya han sido utilizadas en Cp (Lunt y col., 1996; Lunt y col., 1998) y permitiría caracterizar citotipos e intentar buscar un nexo entre ellos y la infección por *Wolbachia*. Esto ya ha sido realizado en otros modelos con interesantes resultados (Dyer y col., 2011; Müller y col., 2012; Xiao y col., 2012).

Wolbachia y su efecto en la recombinación de *Chorthippus parallelus*

Son numerosos los trabajos realizados sobre *Wolbachia* y su biología. En los últimos años se ha obtenido mucha información sobre su distribución geográfica, filogenia y sus efectos en sus diferentes huéspedes (ver revisión en Saridaki y Bourtzis, 2010). Pero poco se sabe de cómo se producen éstos, que vías y mecanismos tiene la bacteria para inducir partenogénesis, incompatibilidad citoplasmática o cualquier otro efecto en su huésped. Hasta la fecha se han podido constatar efectos positivos y negativos de la infección en su hospedador. En algunos casos, se ha descrito una asociación entre la presencia de la infección y la infertilidad masculina (Lewis y col., 2011), se han identificado incluso patrones de segregación cromosómica paterna anómala en la meiosis I como indicadores de la incompatibilidad citoplasmática producida por

Wolbachia (Tram y col., 2006). En otros casos, la infección por *Wolbachia* tiene efectos en la reproducción de las hembras, induciendo a partenogénesis (Adachi-Hagimori y col., 2008).

También hay que señalar que la combinación endosimbionte-hospedador a veces es tan íntima, que éste necesita de la infección para desarrollar sus células germinales adecuadamente (Puttaraju y Prakash, 2009). Parece evidente que, para *Wolbachia*, la línea germinal de su hospedador es algo más que el canal hacia su dispersión. Y así se ha podido constatar en el presente estudio, donde se ha observado un incremento del número medio de quiasmas por célula en aquellos individuos que presentaban infección. Sólo hemos encontrado un estudio con objetivos similares, que analiza, en lugar de quiasmas, la recombinación entre 2 loci concretos (Serga y col. 2010). En este estudio, los autores no encontraron una relación entre los niveles de recombinación dados entre los genes *white* y *cut* en el cromosoma X de *Drosophila* y la infección por *Wolbachia*. Si bien ellos mismos reconocen que la región del genoma en la que determinan las tasas de recombinación presenta una gran frecuencia de elementos transponibles, algo que, bajo nuestro punto de vista, podría haber influido en los resultados obtenidos.

En el presente trabajo se ha observado que la infección por *Wolbachia* está asociada con un incremento de la frecuencia de quiasmas en Cp, independientemente de la constitución nuclear de éste (Cpp, Cpe o híbrido). Sin embargo las implicaciones de este hallazgo son difíciles de establecer. El incremento estadísticamente significativo detectado no tiene por qué suponer un cambio biológico significativo pues, aunque estadísticamente diferentes, los valores de las frecuencias son muy próximos ($15,71 \pm 1,21$ en los individuos infectados y $15,01 \pm 0,93$ en los no infectados). Probablemente esta ligera variación en el número de quiasmas no tenga ninguna implicación en el *fitness* de los individuos infectados. Es cierto que un incremento en la frecuencia de quiasmas podría conllevar una mayor frecuencia de recombinación y por tanto una mayor producción de gametos recombinantes, asociados a una mayor variabilidad. Sin embargo, el incremento en la frecuencia de quiasmas observado en este caso entre los

grupos es tan ligero que hace difícil asumir que este efecto pueda estar actuando de manera clara. Y esto a pesar de que en el contexto de una zona híbrida como modelo para estudiar los procesos de especiación, la recombinación puede tener un importante papel (Kobayashi y Telschow, 2011).

También es difícil correlacionar esta variación en la frecuencia de quiasmas con alguna ventaja en la transmisión de *Wolbachia* o en su biología. Por ello no se puede asumir que este efecto observado sea algo intrínseco a la bacteria. Sin embargo, este fenómeno podría ser un efecto indirecto de la modificación de la cromatina inducida por *Wolbachia* en los individuos infectados, reforzando así la hipótesis del modelo mod/resc (Werren, 1997). Desde un punto de vista selectivo, este efecto secundario (incremento en el número de quiasmas) podría considerarse entre “neutro” y “ligeramente favorable” para los individuos infectados, lo cual explicaría su mantenimiento en ellos. Se uniría así a la lista de efectos entre mutualistas y beneficiosos descritos anteriormente para *Wolbachia* (Vavre y col., 1999; Weeks y col., 2007; Moran y col., 2008; Unckless y Jaenike, 2012). La hipótesis de la “recombinación inducida” implica un incremento adaptativo de la recombinación en individuos en respuesta a una “agresión ambiental” como puede ser la presencia de un elemento parásito (Bell y Burt, 1990; Camacho y col., 2002). Sin embargo y como se señala anteriormente, cada vez es más habitual considerar a *Wolbachia* como un endosimbionte más que como un parásito, dados los efectos beneficiosos o mutualistas registrados en diferentes organismos (Werren y col., 2008). Esto hace que esta hipótesis no parezca de aplicación en nuestro caso. Ahora bien, estudios adicionales en otros sistemas *Wolbachia*-huésped serían necesarios para comprobar si este efecto en el entrecruzamiento es una peculiaridad de nuestro modelo, o un resultado intrínseco de esta infección bacteriana.

Wolbachia y su efecto en la espermatogénesis de *Chorthippus parallelus*

Como se puede ver en los resultados, es reseñable el efecto de *Wolbachia* en la morfología de las espermatidas (macroespermatidas, microespermatidas y espermatidas amorfas) en individuos infectados de Cp. El efecto de la infección a este nivel es, también, una nueva aportación al modelo de la zona híbrida pirenaica de Cp. La frecuencia de espermatidas anormales observada en Cp puros no infectados (0,74%) es similar a lo descrito como estándar en otros saltamontes (Teruel y col., 2009). Sin embargo, la proporción de espermatidas anormales encontradas en individuos híbridos no infectados fue significativamente mayor (2,04%). Además, los resultados revelan que el efecto de la infección aumenta significativamente esta variable en los individuos que pertenecen a una población híbrida con respecto a las poblaciones puras, mostrando un patrón único exclusivo de la zona híbrida pirenaica (incrementando desde el 3,21% en individuos puros infectados hasta el 6,09% en híbridos infectados).

Es difícil evaluar si esta proporción de esperma anormal afecta la fertilidad o la fecundidad de los individuos afectados en términos de *fitness*. Esta reducción probablemente afecte al número de espermatozoides viables producidos por los machos infectados, pero no al número de descendientes esperados para una población dada cuyos individuos estén afectados por esta desventaja. En insectos, el esperma se almacena en la espermateca de la hembra, por lo que no se espera que esta reducción en el número de espermatozoides morfológicamente normales, pueda afectar a la disponibilidad de espermatozoides en la hembra (ver Reinhardt, 2006). Así pues, los datos obtenidos apuntan a que los individuos híbridos puedan tener en este sentido características más mermadas que los puros, tal vez asociadas a alguna fuerza selectiva típica en las “zonas híbridas de tensión” (Barton y Hewitt, 1985), pero no se puede asegurar que esto tenga un efecto en la dinámica de las poblaciones.

De nuevo es difícil mantener que esta alteración en el esperma del huésped pueda ayudar de algún modo a la transmisión de *Wolbachia*. Estos cambios morfológicos pueden aportar una explicación a nivel celular de la reducción de la fertilidad observada

en machos de *Drosophila* infectados por esta bacteria. Análisis con microscopía óptica y electrónica de la espermatogénesis de este organismo han revelado alteraciones en los procesos de maduración del esperma, tales como núcleos en posición basal, espermatozoides fusionados y axonemas mal orientados y con forma doble (Snook y col., 2000; Champion de Crespigny y Wedell, 2006; Riparbelli y col., 2007; Serbus y col., 2008). Pero no se sabe si estos son efectos directos de la bacteria. Parece más plausible atribuir, al menos en nuestras observaciones, este hecho a un efecto colateral secundario de la infección. En cualquier caso, nuestros resultados sugieren la existencia de una asociación entre la presencia de *Wolbachia* y modificaciones morfológicas en las células germinales masculinas del saltamontes, y por tanto respaldan, en ese sentido, el modelo mod/resc propuesto para explicar la IC producida por *Wolbachia*.

CONCLUSIONES

- Las poblaciones de *Chorthippus parallelus* distribuidas a lo largo del puerto Viejo de Sallent presentan unas frecuencias para los marcadores citogenéticos similares a las que se observaron con anterioridad en el puerto de Portalet. Sin embargo la banda H, característica de los individuos híbridos, se ha detectado en frecuencias bajísimas, apuntando su origen en alguna población cercana al puerto de Portalet.
- Los microsatélites analizados se han mostrado como una buena herramienta, de gran resolución, para el estudio de la estructura genética de las poblaciones de *Chorthippus parallelus* en su zona híbrida del Pirineo resultando ser, en los individuos estudiados, muy polimórficos.
- Estos marcadores han confirmado una estructuración de las poblaciones de *Chorthippus parallelus* según la probable constitución genética de sus ancestros en puras, para una u otra subespecie, o híbridas, poniendo de manifiesto la condición de zona híbrida unimodal de este modelo.
- La infección por *Wolbachia pipientis* que presenta *Chorthippus parallelus* es diversa y está ampliamente distribuida, pero no de manera uniforme, pues la infección muestra distinta incidencia y distintas cepas según las poblaciones de la zona híbrida. De esta manera se ha observado una mayor proporción de individuos infectados por la cepa F en las poblaciones puras de *Chorthippus parallelus erythropus* en comparación con las poblaciones híbridas y las puras de *Chorthippus parallelus parallelus*, en las que predominan los coinfectados e infectados por B, respectivamente. Estas cepas, además, se estructuran según un patrón geográfico determinado que, en algunos casos, se puede asociar con el carácter puro o híbrido de las poblaciones infectadas.

- No se ha encontrado asociación estadística entre el tipo de infección por *Wolbachia pipientis* que presenta un individuo de *Chorthippus parallelus* y el patrón de bandas heterocromáticas que muestra su cromosoma X. Pero se han detectado tendencias que podrían estar indicando un vínculo entre estas dos variables.
- *Wolbachia pipientis* está asociada a dos efectos en la espermatogénesis de *Chorthippus parallelus*. Su presencia está ligada a un incremento en el número de quiasmas durante la meiosis y a un mayor número de espermátidas anómalas. Este último efecto, además, es sinérgico, acentuándose en los individuos híbridos. Estas observaciones podrían apoyar el modelo *mod/resc* propuesto para explicar la incompatibilidad citoplasmática originada por la bacteria.
- Por último, señalar que nuestros resultados apuntan a un escenario en el que a la zona híbrida descrita de *Chorthippus parallelus* se superpone otra de tipo bacteriano, formada por las distintas cepas de *Wolbachia pipientis* que infectan a este ortóptero.

CONCLUSIONS

- *Chorthippus parallelus* populations distributed along the pass Viejo de Sallent present cytogenetic marker frequencies similar to those previously observed in the pass of Portalet. However the H band, characteristic of the hybrid individuals, has been detected in very low frequencies, suggesting its origin in a population near the pass of Portalet.
- The microsatellites analysed have proved to be a good high resolution tool for the study of the genetic structure of *Chorthippus parallelus* populations in the Pyrenean hybrid zone. These markers have been shown to be highly polymorphic in the individuals studied.
- Microsatellite analyses have confirmed a populations structure corresponding to the pattern of the probable genetic background of the ancestors, in either pure *Chorthippus parallelus erythropus*, pure *Chorthippus parallelus parallelus* or hybrid. This organisation supports the unimodal distribution of this hybrid zone.
- The *Wolbachia pipientis* infection present in *Chorthippus parallelus* is diverse and widespread but not uniform, showing different incidence levels and strains in different populations of the hybrid zone. Accordingly, a higher proportion of F-strain infected individuals in the *Chorthippus parallelus erythropus* populations have been observed in comparison to the *Chorthippus parallelus parallelus* and hybrid populations, which contain mainly co-infected and B-infected individuals respectively. These strains are distributed according to a geographical pattern that, in some instances, can be associated with the hybrid or pure nature of the *Chorthippus parallelus* populations.

- No statistical association was found between the type of infection present in a *Chorthippus parallelus* individual and its X-chromosome heterochromatin banding pattern. But some trends indicating a link between these two variables have been detected.
- *Wolbachia pipientis* is associated with two effects on *Chorthippus parallelus* spermatogenesis. Its presence is linked to an increase in the number of chiasmata during meiosis as well as an increase in the number of abnormal spermatids. This latter effect is synergistic, being more evident in hybrid individuals. Observations herein may support the mod/resc model proposed to explain the cytoplasmic incompatibility caused by the bacterium.
- Finally, our results highlight a scenario in which the described hybrid zone of *Chorthippus parallelus* overlaps with another hybrid zone of bacterial type formed by the different *Wolbachia* strains ascribed to infect this orthopteroid.

BIBLIOGRAFÍA

Abercrombie, L.G., Anderson, C.M., Baldwin, B.G., Bang, I.C., Beldade, R., Bernardi, G., Boubou, A., Branca, A., Bretagnolle, F., M. W, B., y col. (2009). Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources database 1 January 2009–30 April 2009. *Molecular Ecology Resources* 9, 1375-1379.

Adachi-Hagimori, T., Miura, K., y Stouthamer, R. (2008). A new cytogenetic mechanism for bacterial endosymbiont-induced parthenogenesis in Hymenoptera. *Proceedings Biological Sciences* 275, 2667-2673.

Albrechtova, J., Albrecht, T., Baird, S.J., Macholan, M., Rudolfsen, G., Munclinger, P., Tucker, P.K., y Pialek, J. (2012). Sperm-related phenotypes implicated in both maintenance and breakdown of a natural species barrier in the house mouse. *Proceedings. Biological Science / The Royal Society*. En prensa.

Arias, C.F., Muñoz, A.G., Jiggins, C.D., Marvárez, J., Bermingham, E., y Linares, M. (2008). A hybrid zone provides evidence for incipient ecological speciation in *Heliconius* butterflies. *Molecular Ecology* 17, 4699-4712.

Arias, C.F., Rosales, C., Salazar, C., Castano, J., Bermingham, E., Linares, M., y McMillan, W.O. (2012). Sharp genetic discontinuity across a unimodal *Heliconius* hybrid zone. *Molecular Ecology*. En prensa.

Augustinos, A.A., Santos-Garcia, D., Dionyssopoulou, E., Moreira, M., Papapanagiotou, A., Scarvelakis, M., Doudoumis, V., Ramos, S., Aguiar, A.F., Borges, P.A.V., y col. (2011). Detection and Characterization of *Wolbachia* Infections in Natural Populations of Aphids: Is the Hidden Diversity Fully Unraveled? *PLoS ONE* 6, e28695.

Baldo, L., Bartos, J.D., Werren, J.H., Bazzocchi, C., Casiraghi, M., y Panelli, S. (2002). Different rates of nucleotide substitutions in *Wolbachia* endosymbionts of arthropods and nematodes: arms race or host shifts? *Parassitologia* 44, 179-187.

Baldo, L., Lo, N., y Werren, J.H. (2005). Mosaic Nature of the *Wolbachia* Surface Protein. *Journal of Bacteriology* 187, 5406-5418.

Baldo, L., Hotopp, J.C.D., Jolley, K.A., Bordenstein, S.R., Biber, S.A., Choudhury, R.R., Hayashi, C., Maiden, M.C.J., Tettelin, H., y Werren, J.H. (2006). Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 7098-7110.

Baldo, L., Prendini, L., Corthals, A., y Werren, J. (2007). *Wolbachia* Are Present in Southern African Scorpions and Cluster with Supergroup F. *Current Microbiology* 55, 367-373.

Baldo, L., y Werren, J. (2007). Revisiting *Wolbachia* Supergroup Typing Based on WSP: Spurious Lineages and Discordance with MLST. *Current Microbiology* 55, 81-87.

Baldo, L., Ayoub, N.A., Hayashi, C.Y., Russell, J.A., Stahlhut, J.K., y Werren, J.H. (2008). Insight into the routes of *Wolbachia* invasion: high levels of horizontal transfer in the spider genus *Agelenopsis* revealed by *Wolbachia* strain and mitochondrial DNA diversity. *Molecular Ecology* 17, 557-569.

Barton, N. (2001). The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* 10, 551-568.

Barton, N.H., y Hewitt, G.M. (1985). Analysis of Hybrid Zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16, 113-148.

Begg, K.J., y Donachie, W.D. (1985). Cell shape and division in *Escherichia coli*: experiments with shape and division mutants. *Journal of Bacteriology* 163, 615-622.

Bell, G., y Burt, A. (1990). B-chromosomes: germ-line parasites which induce changes in host recombination. *Parasitology* 100, S19-S26.

Bella, J., Martínez-Rodríguez, P., Arroyo-Yebras, F., Bernal, A., Sarasa, J., Fernández-Calvín, B., Mason, P.L., y Zabal-Aguirre, M. (2010). *Wolbachia* Infection in the *Chorthippus parallelus* Hybrid Zone: Evidence for Its Role as a Reproductive barrier. *Journal of Orthoptera Research* 19, 205-212.

Bella, J.L., Butlin, R.K., Ferris, C., y Hewitt, G.M. (1992). Asymmetrical homogamy and unequal sex ratio from reciprocal mating-order crosses between *Chorthippus parallelus* subspecies. *Heredity* 68, 345-352.

Bella, J.L., Hewitt, G.M., y Gosálbez, J. (1990). Meiotic imbalance in laboratory-produced hybrid males of *Chorthippus parallelus parallelus* and *Chorthippus parallelus erythropus*. *Genetical Research* 5, 43-48.

Bella, J.L., Serrano, L., Hewitt, G.M., y Gosálbez, J. (1993). Heterochromatin heterogeneity and rapid divergence of the sex chromosomes in *Chorthippus parallelus parallelus* and *C. p. erythropus* (Orthoptera). *Genome* 36, 542-547.

Bella, J.L., Serrano, L., Orellana, J., y Mason, P.L. (2007). The origin of the *Chorthippus parallelus* hybrid zone: chromosomal evidence of multiple refugia for Iberian populations. *Journal of Evolutionary Biology* 20, 568-576.

Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., y Sayers, E.W. (2011). GenBank. *Nucleic Acids Research* 39, D32-37.

Blanchet, E., Pages, C., Blondin, L., Billot, C., Rivallan, R., Vassal, J., Lecoq, M., Risterucci, A. (2010). Isolation of Microsatellite Markers in the *Calliptamus* genus (Orthoptera, Acrididae). *Journal of Insect Science* 10, 1–6.

Bordenstein, S.R., O'Hara, F.P., y Werren, J.H. (2001). *Wolbachia*-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature* 409, 707-710.

Bordenstein, S.R. (2003). Symbiosis and the origin of species. En *Insect Symbiosis*, K. Bourtzis, y T. Miller, eds. (New York, NY, CRC Press), pp. 283-304.

Bordenstein, S., y Rosengaus, R.B. (2005). Discovery of a novel *Wolbachia* super group in Isoptera. *Current Microbiology* 51, 393-398.

Bossan, B., Koehncke, A., y Hammerstein, P. (2011). A New Model and Method for Understanding *Wolbachia* Induced Cytoplasmic Incompatibility. *PLoS ONE* 6, e19757.

Bradley, R.D., Bull, J.J., Johnson, A.D., y Hillis, D.M. (1993). Origin of a novel allele in a mammalian hybrid zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 8939-8941.

Breeuwer, J.A., Stouthamer, R., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Weisburg, W.G., y Werren, J.H. (1992). Phylogeny of cytoplasmic incompatibility micro-organisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect Molecular Biology* 1, 25-36.

Brennan, A.C., Bridle, J.R., Wang, A.L., Hiscock, S.J., y Abbott, R.J. (2009). Adaptation and selection in the *Senecio* (Asteraceae) hybrid zone on Mount Etna, Sicily. *New Phytol* 183, 702-717.

Brueggemann, A.B., Griffiths, D.T., Meats, E., Peto, T., Crook, D.W., y Spratt, B.G. (2003). Clonal Relationships between Invasive and Carriage *Streptococcus pneumoniae* and Serotype- and Clone-Specific Differences in Invasive Disease Potential. *Journal of Infectious Diseases* 187, 1424-1432.

Buño, I., Torroja, E., López-Fernández, C., Butlin, R.K., Hewitt, G.M., y Gosálvez, J. (1994). A hybrid zone between two subspecies of the grasshopper *Chorthippus parallelus* along the Pyrenees: the west end. *Heredity* 73, 625-634.

Burke, J.M., y Arnold, M.L. (2001). Genetics and the Fitness of Hybrids. *Annual Review of Genetics* 35, 31-52.

Buschiazzi, E., y Gemmell, N.J. (2006). The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays* 28, 1040-1050.

Butlin, R.K., y Hewitt, G.M. (1985a). A hybrid zone between *Chorthippus parallelus parallelus* and *Chorthippus parallelus erythropus* (Orthoptera: Acrididae): behavioural characters. Biological Journal of the Linnean Society 26, 287-299.

Butlin, R.K., y Hewitt, G.M. (1985b). A hybrid zone between *Chorthippus parallelus parallelus* and *Chorthippus parallelus erythropus* (Orthoptera: Acrididae): morphological and electrophoretic characters. Biological Journal of the Linnean Society 26, 269-285.

Butlin, R.K., y Ritchie, M.G. (1991). Variation in female mate preference across a grasshopper hybrid zone. Journal of Evolutionary Biology 4, 227-240.

Butlin, R.K., Ritchie, M.G., y Hewitt, G.M. (1991). Comparisons among Morphological Characters and between Localities in the *Chorthippus parallelus* Hybrid Zone (Orthoptera: Acrididae). Philosophical Transactions: Biological Sciences 334, 297-308.

Camacho, J.P.M., Bakkali, M., Corral, J.M., Cabrero, J., López-León, M.D., Aranda, I., Martín-Alganza, A., y Perfectti, F. (2002). Host recombination is dependent on the degree of parasitism. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences 269, 2173-2177.

Campbell, B.C., Bragg, T.S., y Turner, C.E. (1992). Phylogeny of symbiotic bacteria of four weevil species (coleoptera: curculionidae) based on analysis of 16S ribosomal DNA. Insect Biochemistry and Molecular Biology 22, 415-421.

Cao, P., McClain, M.S., Forsyth, M.H., y Cover, T.L. (1998). Extracellular Release of Antigenic Proteins by *Helicobacter pylori*. Infection and Immunity 66, 2984-2986.

Carlsson, J. (2008). Effects of Microsatellite Null Alleles on Assignment Testing. Journal of Heredity 99, 616-623.

Casiraghi, M., Bordenstein, S.R., Baldo, L., Lo, N., Beninati, T., Wernegreen, J.J., Werren, J.H., y Bandi, C. (2005). Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. Microbiology 151, 4015-4022.

Casiraghi, M., Favia, G., Cancrini, G., Bartoloni, A., y Bandi, C. (2001). Molecular identification of *Wolbachia* from the filarial nematode *Mansonella ozzardi*. Parasitology Research 87, 417-420.

Champion de Crespigny, F.E., y Wedell, N. (2006). *Wolbachia* infection reduces sperm competitive ability in an insect. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 273, 1455-1458.

Chapuis, M.-P., y Estoup, A. (2007). Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. Molecular Biology and Evolution 24, 621-631.

- Chapuis, M.P., Lecoq, M., Michalakis, Y., Loiseau, A., Sword, G.A., Piry, S., y Estoup, A. (2008). Do outbreaks affect genetic population structure? A worldwide survey in *Locusta migratoria*, a pest plagued by microsatellite null alleles. *Molecular Ecology* 17, 3640-3653.
- Charlat, S., Calmet, C., y Merv  ot, H. (2001). On the mod resc Model and the Evolution of *Wolbachia* Compatibility Types. *Genetics* 159, 1415-1422.
- Charlat, S., Hurst, G.D.D., y Mer  ot, H. (2003). Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends in Genetics* 19, 217-223.
- Charlat, S., Davies, N., Roderick, G.K., y Hurst, G.D. (2007). Disrupting the timing of *Wolbachia*-induced male-killing. *Biology Letters* 3, 154-156.
- Contreras-D  az, H., L  pez, H., Orom  , P., y Juan, C. (2006). Microsatellite loci development in endangered pamphagid grasshoppers endemic to the Canary Islands (Orthoptera). *Conservation Genetics* 7, 767-771.
- Cook, J.M., y Butcher, R.D.J. (1999). The transmission and effects of *Wolbachia* bacteria in parasitoids. *Researches on Population Ecology* 41, 15-28.
- Cooper, S.J., y Hewitt, G.M. (1993). Nuclear DNA sequence divergence between parapatric subspecies of the grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Insect Molecular Biology* 2, 185-194.
- Cordaux, R., Bouchon, D., y Gr  ve, P. (2011). The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. *Trends in Genetics* 27, 332-341.
- Coyne, J.A. (1992). Genetics and speciation. *Nature* 355, 511-515.
- Dale, C., Beeton, M., Harbison, C., Jones, T., y Pontes, M. (2006). Isolation, pure culture, and characterization of "*Candidatus Arsenophonus arthropodicus*," an intracellular secondary endosymbiont from the hippoboscid louse fly *Pseudolynchia canariensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2997-3004.
- Dieringer, D., y Schl  tterer, C. (2003). Microsatellite Analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3, 167-169.
- Dillon, R.J., Webster, G., Weightman, A.J., Dillon, V.M., Blanford, S., y Charnley, A.K. (2008). Composition of Acridid gut bacterial communities as revealed by 16S rRNA gene analysis. *Journal of Invertebrate Pathology* 97, 265-272.
- Dyer, K.A., Burke, C., y Jaenike, J. (2011). *Wolbachia*-mediated persistence of mtDNA from a potentially extinct species. *Molecular Ecology* 20, 2805-2817.

Enright, M.C., y Spratt, B.G. (1999). Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology* 7, 482-487.

Evanno, G., Regnaut, S., y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611-2620.

Fenn, K., Conlon, C., Jones, M., Quail, M.A., Holroyd, N.E., Parkhill, J., y Blaxter, M. (2006). Phylogenetic Relationships of the *Wolbachia* of Nematodes and Arthropods. *PLoS Pathog* 2, e94.

Fenton, A., Johnson, K.N., Brownlie, J.C., y Hurst, G.D.D. (2011). Solving the *Wolbachia* Paradox: Modeling the Tripartite Interaction between Host, *Wolbachia*, and a Natural Enemy. *The American Naturalist* 178, 333-342.

Ferris, C., Rubio, J.M., Serrano, L., Gosálvez, J., y Hewitt, G.M. (1993). One way introgression of a subspecific sex chromosome marker in a hybrid zone. *Heredity* 71, 119-129.

Filatov, D.A. (2009). Processing and population genetic analysis of multigenic datasets with ProSeq3 software. *Bioinformatics* 25, 3189-3190.

Finger, A., y Klank, C. (2010). Review Molecular Methods: Blessing or Curse? En *Relict Species*, J.C. Habel, y T. Assmann, eds. (Heidelberg, Springer), pp. 309-320.

Flanagan, N.S., Mason, P.L., Gosálvez, J. y Hewitt, G. (1999). Chromosomal differentiation through an Alpine hybrid zone in the grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Journal of Evolutionary Biology* 12, 577-585.

François, R. (2008). GENEPOP'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8, 103-106.

Frost, C.L., Fernández-Marín, H., Smith, J.E., y Hughes, W.O.H. (2010). Multiple gains and losses of *Wolbachia* symbionts across a tribe of fungus-growing ants. *Molecular Ecology* 19, 4077-4085.

García, S., Garnatje, T., Pellicer, J., McArthur, E.D., Siljak-Yakovlev, S., y Vallès, J. (2009). Ribosomal DNA, heterochromatin, and correlation with genome size in diploid and polyploid North American endemic sagebrushes (*Artemisia*, Asteraceae). *Genome* 52, 1012-1024.

Garner, T.W. (2002). Genome size and microsatellites: the effect of nuclear size on amplification potential. *Genome* 45, 212-215.

Gay, L., Crochet, P.-A., Bell, D.A., y Lenormand, T. (2008). Comparing clines on molecular and phenotypic traits in hybrid zones: a window on tension zone models. *Evolution* 62, 2789-2806.

Gibson, C.M., y Hunter, M.S. (2009). Inherited fungal and bacterial endosymbionts of a parasitic wasp and its cockroach host. *Microbial Ecology* 57, 542-549.

Gibson, J.L., y Tabita, F.R. (1988). Localization and mapping of CO₂ fixation genes within two gene clusters in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology* 170, 2153-2158.

Giordano, R., O'Neill, S.L., y Robertson, H.M. (1995). *Wolbachia* Infections and the Expression of Cytoplasmic Incompatibility in *Drosophila sechellia* and *D. mauritiana*. *Genetics* 140, 1307-1317.

Giordano, R., Jackson, J.J., y Robertson, H.M. (1997). The role of *Wolbachia* bacteria in reproductive incompatibilities and hybrid zones of *Diabrotica* beetles and *Gryllus* crickets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 11439-11444.

Godoy, D., Randle, G., Simpson, A.J., Aanensen, D.M., Pitt, T.L., Kinoshita, R., y Spratt, B.G. (2003). Multilocus Sequence Typing and Evolutionary Relationships among the Causative Agents of Melioidosis and Glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 2068-2079.

Gomez, A., y Lunt, D. (2007). Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. En *Phylogeography of Southern European Refugia*, S. Weiss, y N. Ferrand, eds. (Dordrecht, Springer), pp. 155-188.

Gompert, Z., Lucas, L.K., Fordyce, J.A., Forister, M.L., y Nice, C.C. (2010). Secondary contact between *Lycaeides idas* and *L. melissa* in the Rocky Mountains: extensive admixture and a patchy hybrid zone. *Molecular Ecology* 19, 3171-3192.

Goodacre, S.L., Martin, O.Y., Thomas, C.F.G., y Hewitt, G.M. (2006). *Wolbachia* and other endosymbiont infections in spiders. *Molecular Ecology* 15, 517-527.

Gosálvez, J., López-Fernández, C., Bella, J.L., Butlin, R.K., y Hewitt, G.M. (1988). A hybrid zone between *Chorthippus parallelus parallelus* and *Chorthippus parallelus erythropus* (Orthoptera: Acrididae): chromosomal differentiation. *Genome* 30, 656-663.

Gosalvez, J., Lopez-Fernandez, C., Serrano, L., Rubio, J.M., y Hewitt, C.M. (1990). Chromosome structure in hybrid zones of *Chorthippus parallelus parallelus* and *Chorthippus parallelus erythropus*. *Boletín de sanidad vegetal Plagas (Fuera de serie)* 20, 41-348.

Gray, D.A., y Cade, W.H. (2000). Sexual selection and speciation in field crickets. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 97, 14449-14454.

Haag-Liautard, C., Coffey, N., Houle, D., Lynch, M., Charlesworth, B., y Keightley, P.D. (2008). Direct Estimation of the Mitochondrial DNA Mutation Rate in *Drosophila melanogaster*. PLoS Biology 6, e204.

Haberman, S.J. (1973). The Analysis of Residuals in Cross-Classified Tables. Biometrics 29, 205-220.

Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41, 95-98.

Harrison, R. (1990). Hybrid zones: Windows of evolutionary process. En Oxford Surveys in Evolutionary Biology, F. D., y A. J., eds. (Oxford, Oxford University Press), pp. 69-128.

Harrison, R. (1993). Hybrid zones and the evolutionary process (Oxford, Oxford University Press).

Harrison, R.G., y Bogdanowicz, S.M. (1997). Patterns of Variation and Linkage Disequilibrium in a Field Cricket Hybrid Zone. Evolution 51, 493-505.

Hewitt, G.M. (1975). A sex-chromosome hybrid zone in the grasshopper *Podisma pedestris* (Orthoptera: Acrididae). Heredity 35, 375-387.

Hewitt, G.M., Butlin, R.K., y East, T.M. (1987). Testicular dysfunction in hybrids between parapatric subspecies of the grasshopper *Chorthippus parallelus*. Biological Journal of the Linnean Society 31, 25-34.

Hewitt, G.M. (1988). Hybrid zones-natural laboratories for evolutionary studies. Trends in Ecology & Evolution 3, 158-167.

Hecker, K.H., y Roux, K.H. (1996). High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. Biotechniques 20, 478-485.

Hewitt, G.M. (2001). Speciation, hybrid zones and phylogeography — or seeing genes in space and time. Molecular Ecology 10, 537-549.

Hewitt, G. (2011). Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. Genetica 139, 617-638.

Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A. y Werren, J.H. (2008). How many species are infected with Wolbachia?—A statistical analysis of current data. FEMS Microbiol Letters 281, 215–220.

Hoffmann, A.A. (2005). Entomology incompatible mosquitoes. Nature 436, 189-189.

Hotopp, J.C.D., Clark, M.E., Oliveira, D.C.S.G., Foster, J.M., Fischer, P., Torres, M.n.C.M.o., Giebel, J.D., Kumar, N., Ishmael, N., Wang, S., y col. (2007). Widespread

Lateral Gene Transfer from Intracellular Bacteria to Multicellular Eukaryotes. *Science* 317, 1753-1756.

Howard, D., Britch, S., Braswell, W., y Marshall, J. (2003). Evolution in hybrid zones. In *The Evolution of Population Biology*, R.K. Sing, y M.K. Uyenoyama, eds. (Cambridge, Cambridge University Press), pp. 297-314.

Huelsenbeck, J.P., y Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754-755.

Hurst, G.D., y Jiggins, F.M. (2000). Male-killing bacteria in insects: mechanisms, incidence, and implications. *Emerging Infectious Diseases* 6, 329-336.

Hurst, G.D.D., y Werren, J.H. (2001). The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. *Nature reviews Genetics* 2, 597-606.

Huxley, J. (1938). Clines: an Auxiliary Taxonomic Principle. *Nature* 142, 219-220.

Jiggins, C.D., y Mallet, J. (2000). Bimodal hybrid zones and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* 15, 250-255.

Jiggins, F.M., Hurst, G.D.D., y Yang, Z. (2002). Host-Symbiont Conflicts: Positive Selection on an Outer Membrane Protein of Parasitic but not Mutualistic Rickettsiaceae. *Molecular Biology and Evolution* 19, 1341-1349.

John, B., y Hewitt, G.M. (1966). A polymorphism for heterochromatic supernumerary segments in *Chorthippus parallelus*. *Chromosoma* 18, 254-271.

John, B., y Lewis, K. (1983). *The meiotic mechanism*, 2 edn (London, Oxford University Press).

Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezuk, Y., McGinnis, S., y Madden, T.L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research* 36, W5-W9.

Jolley, K.A., Kalmusova, J., Feil, E.J., Gupta, S., Musilek, M., Kriz, P., y Maiden, M.C.J. (2000). Carried Meningococci in the Czech Republic: a Diverse Recombining Population. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 4492-4498.

Jolley, K.A., Feil, E.J., Chan, M.-S., y Maiden, M.C.J. (2001). Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics* 17, 1230-1231.

Jolley, K.A., Chan, M.-S., y Maiden, M. (2004). mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* 5, 86.

Keiser, P.B., Coulibaly, Y., Kubofcik, J., Diallo, A.A., Klion, A.D., Traore, S.F., y Nutman, T.B. (2008). Molecular identification of *Wolbachia* from the filarial nematode *Mansonella perstans*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 160, 123-128.

Keller, I., Veltsos, P., y Nichols, R.A. (2008). The frequency of rDNA variants within individuals provides evidence of population history and gene flow across a grasshopper hybrid zone. *Evolution* 62, 833-844.

Key, K.H.L. (1968). The Concept of Stasipatric Speciation. *Systematic Zoology* 17, 14-22.

Kholodova, M. (2009). Comparative phylogeography: Molecular methods, ecological interpretation. *Molecular Biology* 43, 847-854.

Klasson, L., Kambris, Z., Cook, P., Walker, T., y Sinkins, S. (2009). Horizontal gene transfer between *Wolbachia* and the mosquito *Aedes aegypti*. *BMC Genomics* 10, 33.

Knight, J. (2001). Meet the Herod bug. *Nature* 412, 12-14.

Kobayashi, Y., y Telschow, A. (2011). The concept of effective recombination rate and its application in speciation theory. *Evolution* 65, 617-628.

Kodandaramaiah, U., Weingartner, E., Janz, N., Dalén, L., y Nylin, S. (2011). Population structure in relation to host-plant ecology and *Wolbachia* infestation in the comma butterfly. *Journal of Evolutionary Biology* 10, 2173-2185.

Kondo, N., Nikoh, N., Ijichi, N., Shimada, M., y Fukatsu, T. (2002). Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 14280-14285.

Korkmaz, E.M.S., Musa, S. y Başibüyük, H.H. (2010). Genetic Structure of *Chorthippus parallelus* (Orthoptera: Acrididae: Gomphocerinae) Populations in Anatolia: A Stable Rear Edge Population. *Annals of the Entomological Society of America* 103, 625-634.

Kraaijeveld, K., Franco, P., Reumer, B.M., y van Alphen, J.J.M. (2009). Effects of Parthenogenesis and Geographic Isolation on Female Sexual Traits in a Parasitoid Wasp. *Evolution* 63, 3085-3096.

Kremer, N., Charif, D., Henri, H., Bataille, M., Prevost, G., Kraaijeveld, K., y Vavre, F. (2009). A new case of *Wolbachia* dependence in the genus *Asobara*: evidence for parthenogenesis induction in *Asobara japonica*. *Heredity* 103, 248-256.

La Cour, L. (1941). Acetic-Orcein: A New Stain-Fixative for Chromosomes. *Biotechnic & Histochemistry* 16, 169-174.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., y col. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.

Lassy, C.W., y Karr, T.L. (1996). Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Mechanisms of Development* 57, 47-58.

Lewis, Z., Champion de Crespigny, F.E., Sait, S.M., Tregenza, T., y Wedell, N. (2011). *Wolbachia* infection lowers fertile sperm transfer in a moth. *Biology Letters* 7, 187-189.

Lexer, C., Buerkle, C.A., Joseph, J.A., Heinze, B., y Fay, M.F. (2006). Admixture in european *Populus* hybrid zones makes feasible the mapping of loci that contribute to reproductive isolation and trait differences. *Heredity* 98, 74-84.

Li, Y.-C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., y Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11, 2453-2465.

Lo, N., Casiraghi, M., Salati, E., Bazzocchi, C., y Bandi, C. (2002). How Many *Wolbachia* Supergroups Exist? *Molecular Biology and Evolution* 19, 341-346.

López-Fernández, C., y Gosálvez, J. (1981). Differential staining of a heterochromatic zone in *Arcyptera fusca* (Orthoptera). *Cellular and Molecular Life Sciences* 37, 240-241.

Lunt, D.H., Zhang, D.X., Szymura, J.M., y Hewitt, G.M. (1996). The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology* 5, 153-165.

Lunt, D.H., Ibrahim, K.M., y Hewitt, G.M. (1998). mtDNA phylogeography and postglacial patterns of subdivision in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Heredity* 80 (Pt 5), 633-641.

Machtelinckx, T., Van Leeuwen, T., Vanholme, B., Gehesquière, B., Dermauw, W., Vandekerckhove, B., Gheysen, G., y De Clercq, P. (2009). *Wolbachia* induces strong cytoplasmic incompatibility in the predatory bug *Macrolophus pygmaeus*. *Insect Molecular Biology* 18, 373-381.

Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., y col. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 3140-3145.

Mandel, M.J., Ross, C.L., y Harrison, R.G. (2001). Do *Wolbachia* infections play a role in unidirectional incompatibilities in a field cricket hybrid zone? *Molecular Ecology* 10, 703-709.

Maroja, L.S., Andres, J.A., y Harrison, R.G. (2009). Genealogical discordance and patterns of introgression and selection across a cricket hybrid zone. *Evolution* 63, 2999-3015.

Maroja, L.S., Clark, M.E., y Harrison, R.G. (2008). *Wolbachia* plays no role in the one-way reproductive incompatibility between the hybridizing field crickets *Gryllus firmus* and *G. pennsylvanicus*. *Heredity* 101, 435-444.

Martínez, P., Del Castillo, P., y Bella, J. (2009). Cytological detection of *Wolbachia* in squashed and paraffin embedded insect tissues. *Biotechnic and histochemistry*, 1-7.

Mayr, E. (1963). *Animal species and Evolution* (Cambridge, Mass, Harvard University Press).

Mayr, E. (1970). *Populations, species, and evolution: an abridgment of animal species and evolution* (Cambridge, Mass, Harvard University Press).

McDermott, S.R., y Noor, M.A.F. (2011). Genetics of hybrid male sterility among strains and species in the *Drosophila pseudoobscura* species group. *Evolution* 65, 1969-1978.

Miller, D.A., Dev, V.G., Tantravahi, R., y Miller, O.J. (1976). Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. *Experimental Cell Research* 101, 235-243.

Moehring, A.J. (2011). Heterozygosity and its unexpected correlations with hybrid sterility. *Evolution* 65, 2621-2630.

Moran, N.A., McCutcheon, J.P., y Nakabachi, A. (2008). Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. *Annual Review of Genetics* 42, 165-190.

Moritz, C. (1994). Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology* 3, 401-411.

Mouton, L., Henri, H., Charif, D., Boulétreau, M., y Vavre, F. (2007). Interaction between host genotype and environmental conditions affects bacterial density in *Wolbachia* symbiosis. *Biology Letters* 3, 210-213.

Müller, M.J., von Mühlen, C., Valiati, V.H., y Valente, V.L.d.S. (2012). *Wolbachia pipientis* is associated with different mitochondrial haplotypes in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Journal of Invertebrate Pathology* 109, 152-155.

Narita, S., Kageyama, D., Nomura, M., y Fukatsu, T. (2007). Unexpected mechanism of symbiont-induced reversal of insect sex: feminizing *Wolbachia* continuously acts on the butterfly *Eurema hecabe* during larval development. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4332-4341.

Nikoh, N., Tanaka, K., Shibata, F., Kondo, N., Hizume, M., Shimada, M., y Fukatsu, T. (2008). *Wolbachia* genome integrated in an insect chromosome: Evolution and fate of laterally transferred endosymbiont genes. *Genome Research* 18, 272-280.

Nobelmann, B., y Lengeler, J.W. (1996). Molecular analysis of the *gat* genes from *Escherichia coli* and of their roles in galactitol transport and metabolism. *Journal of Bacteriology* 178, 6790-6795.

O'Brian, M.R., y Maier, R.J. (1987). Isolation of a cytochrome *aa3* gene from *Bradyrhizobium japonicum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84, 3219-3223.

Panaram, K., y Marshall, J. (2007). F supergroup *Wolbachia* in bush crickets: what do patterns of sequence variation reveal about this supergroup and horizontal transfer between nematodes and arthropods? *Genetica* 130, 53-60.

Pardo-Diaz, C., Salazar, C., Baxter, S.W., Merot, C., Figueiredo-Ready, W., Joron, M., McMillan, W.O., y Jiggins, C.D. (2012). Adaptive introgression across species boundaries in *Heliconius* butterflies. *PLoS Genet* 8, e1002752.

Parkin, E.J., y Butlin, R.K. (2004). Within- and between-individual sequence variation among ITS1 copies in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus* indicates frequent intrachromosomal gene conversion. *Molecular Biology and Evolution* 21, 1595-1601.

Piganeau, G.I., Gardner, M., y Eyre-Walker, A. (2004). A Broad Survey of Recombination in Animal Mitochondria. *Molecular Biology and Evolution* 21, 2319-2325.

Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1253-1256.

Poudel, R.C., Moller, M., Gao, L.M., Ahrends, A., Baral, S.R., Liu, J., Thomas, P., y Li, D.Z. (2012). Using Morphological, Molecular and Climatic Data to Delimitate Yews along the Hindu Kush-Himalaya and Adjacent Regions. *PLoS ONE* 7, e46873.

Presgraves, D.C. (2000). A Genetic Test of the Mechanism of *Wolbachia*-Induced Cytoplasmic Incompatibility in *Drosophila*. *Genetics* 154, 771-776.

Puttaraju, H.P., y Prakash, B.M. (2009). Effects of elimination of *Wolbachia* on oogenesis of the uzifly *Exorista sorbillans*, a parasitoid of the silkworm *Bombyx mori*. *Entomological Research* 39, 372-379.

Raychoudhury, R., Baldo, L., Oliveira, D.C., y Werren, J.H. (2009). Modes of acquisition of *Wolbachia*: horizontal transfer, hybrid introgression, and codivergence in the *Nasonia* species complex. *Evolution* 63, 165-183.

Reed, K.M., y Werren, J.H. (1995). Induction of paternal genome loss by the paternal-sex-ratio chromosome and cytoplasmic incompatibility bacteria (*Wolbachia*): a comparative study of early embryonic events. *Molecular Reproduction and Development* 40, 408-418.

Reinhardt, K. (2006). Sperm numbers vary between inter- and intra-population matings of the grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Biology Letters* 2, 239-241.

Reynolds, K.T. y Hoffmann, A.A. (2002). Male age, host effects and the weak expression or nonexpression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* strains infected by maternally transmitted *Wolbachia*. *Genetical Research* 80: 79–87.

Reynolds, W.J. (1980). A re-examination of the characters separating *Chorthippus montanus* and *C. parallelus* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Natural History* 14, 283-303.

Riparbelli, M.G., Giordano, R., y Callaini, G. (2007). Effects of *Wolbachia* on sperm maturation and architecture in *Drosophila simulans* Riverside. *Mechanisms of Development* 124, 699-714.

Riparbelli, M.G., Giordano, R., Ueyama, M., y Callaini, G. (2012). *Wolbachia*-Mediated Male Killing Is Associated with Defective Chromatin Remodeling. *PLoS ONE* 7, e30045.

Ritchie, M.G. (1990). Are differences in song responsible for assortative mating between subspecies of the grasshopper *Chorthippus parallelus* (Orthoptera: Acrididae)? *Animal Behaviour* 39, 685-691.

Ritchie, M.G., Butlin, R.K., y Hewitt, G.M. (1989). Assortative mating across a hybrid zone in *Chorthippus parallelus* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Evolutionary Biology* 2, 339-352.

Ros, V.I.D., Fleming, V.M., Feil, E.J., y Breeuwer, J.A.J. (2009). How Diverse Is the Genus *Wolbachia*? Multiple-Gene Sequencing Reveals a Putatively New *Wolbachia* Supergroup Recovered from Spider Mites (Acari: Tetranychidae). *American Society for Microbiology* 75, 1036-1043.

Ross, R.I., Agren, J.A., y Pannell, J.R. (2012). Exogenous selection shapes germination behaviour and seedling traits of populations at different altitudes in a *Senecio* hybrid zone. *Ann Bot.*

Rufas, J., y Gosálvez, J. (1982). Development of silver stained structures during spermatogenesis of *Schistocerca gregaria* (FORSK) (Orthoptera, Acrididae). *Caryologia* 35, 261-267.

Sá-Leão, R., Tomasz, A., y de Lencastre, H. (2001). Multilocus Sequence Typing of *Streptococcus pneumoniae* Clones with Unusual Drug Resistance Patterns: Genetic Backgrounds and Relatedness to Other Epidemic Clones. *Journal of Infectious Diseases* 184, 1206-1210.

Salunke, B.K., Salunkhe, R.C., Dhotre, D.P., Walujkar, S.A., Khandagale, A.B., Chaudhari, R., Chandode, R.K., Ghate, H.V., Patole, M.S., Werren, J.H., y col. (2012). Determination

of *Wolbachia* Diversity in Butterflies from Western Ghats, India, by a Multigene Approach. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 4458-4467.

Sarasa, J. (2009). Análisis del cromosoma X de *Chorthippus parallelus parallelus* y *Chorthippus parallelus erythropus* (Orthoptera), dos taxones involucrados en una zona híbrida. D.E.A. Departamento de Biología (Madrid, Universidad Autónoma de Madrid).

Sarasa, J., Bernal, A., Fernandez-Calvin, B., y Bella, J.L. (2012). *Wolbachia* Induced Cytogenetical Effects as Evidenced in *Chorthippus parallelus* (Orthoptera). *Cytogenetic Genome Research*. Epub antes de impresión.

Saridaki, A. y Bourtzis, K. (2010). *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals. *Current Opinion in Microbiology* 13, 67-72.

Schilthuizen, M., Hoekstra, R.F., y Gittenberger, E. (1999). Selective Increase of a Rare Haplotype in a Land Snail Hybrid Zone. *Proceedings: Biological Sciences* 266, 2181-2185.

Schilthuizen, M., Hoekstra, R.F., y Gittenberger, E. (2001). The 'rare allele phenomenon' in a ribosomal spacer. *Molecular Ecology* 10, 1341-1345.

Schilthuizen, M., Hoekstra, R.F., y Gittenberger, E. (2004). Hybridization, rare alleles and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 404-405; author reply 405-406.

Schilthuizen, M., Giesbers, M.C.W.G., y Beukeboom, L.W. (2011). Haldane's rule in the 21st century. *Heredity* 107, 95-102.

Schlotterer, C., Hauser, M.T., von Haeseler, A., y Tautz, D. (1994). Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution* 11, 513-522.

Seehausen, O. (2004a). Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 198-207.

Seehausen, O. (2004b). Response to Schilthuizen et al.: Hybridization, rare alleles and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 405-406.

Selkoe, K.A., y Toonen, R.J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9, 615-629.

Serbus, L.R., Casper-Lindley, C., Landmann, F.d.r., y Sullivan, W. (2008). The Genetics and Cell Biology of *Wolbachia*-Host Interactions. *Annual Review of Genetics* 42, 683-707.

Serga, S., Demidov, S., y Kozeretska, I. (2010). Infection with *Wolbachia* does not influence crossing-over in *Drosophila melanogaster*. *Cytology and Genetics* 44, 239-243.

Serrano, L. (1994). Zonas Híbridas: el laboratorio natural de Portalet (Pirineo oscense). In Departamento de Biología (Madrid, España, Universidad Autónoma de Madrid).

Serrano, L., Vega, C.G.d.l., Bella, J.L., López-Fernández, C., y Hewitt, G.M. (1996). A hybrid zone between two subspecies of *Chorthippus parallelus*. X-chromosome variation through a contact zone. *Journal of Evolutionary Biology* 9, 173-184.

Sharpe, R.G., Harbach, R.E. and Butlin, R.K. (2000). Molecular variation and phylogeny of members of the Minimus group of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera : Culicidae). *Systematic Entomology* 25, 263-272.

Shaw, P.W., Pierce, G.J., y Boyle, P.R. (1999). Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* 8, 407-417.

Shuker, D.M., Underwood, K., King, T.M., y Butlin, R.K. (2005a). Patterns of male sterility in a grasshopper hybrid zone imply accumulation of hybrid incompatibilities without selection. *Proceedings Biological sciences* 272, 2491-2497.

Shuker, D.M., King, T.M., Bella, J.L., y Butlin, R.K. (2005b). The genetic basis of speciation in a grasshopper hybrid zone. In *Insect Evolutionary Ecology*, M. Fellowes, G. Holloway, y J. Rolff, eds. (CABI Publishing), pp. 427-454.

Singhal, S., y Moritz, C. (2012). Strong selection against hybrids maintains a narrow contact zone between morphologically cryptic lineages in a rainforest lizard. *Evolution* 66, 1474-1489.

Smith, J.M. (1992). Analyzing the mosaic structure of genes. *Journal of Molecular Evolution* 34, 126-129.

Snook, R.R., Cleland, S.Y., Wolfner, M.F., y Karr, T.L. (2000). Offsetting Effects of *Wolbachia* Infection and Heat Shock on Sperm Production in *Drosophila simulans*: Analyses of Fecundity, Fertility and Accessory Gland Proteins. *Genetics* 155, 167-178.

Stahlhut, J.K., Desjardins, C.A., Clark, M.E., Baldo, L., Russell, J.A., Werren, J.H., y Jaenike, J. (2010). The mushroom habitat as an ecological arena for global exchange of *Wolbachia*. *Molecular Ecology* 19, 1940-1952.

Steinmetz, R., Johannesen, J., y Seitz, A. (2004). Clinal genetic variation and the 'rare allele phenomenon' in random mating populations of *Urophora cardui* (Diptera: Tephritidae). *Genetica* 122, 277-290.

Stouthamer, R., Breeuwer, J.A., y Hurst, G.D. (1999). *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiology* 53, 71-102.

- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75, 304-306.
- Tang, M., Lv, L., Jing, S., Zhu, L., y He, G. (2010). Bacterial symbionts of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Applied and Environmental Microbiology* 76, 1740-1745.
- Telschow, A., Yamamura, N., y Werren, J.H. (2005a). Bidirectional cytoplasmic incompatibility and the stable coexistence of two *Wolbachia* strains in parapatric host populations. *Journal of Theoretical Biology* 235, 265-274.
- Telschow, A., Hammerstein, P., y Werren, J.H. (2005b). The effect of *Wolbachia* versus genetic incompatibilities on reinforcement and speciation. *Evolution* 59, 1607-1619.
- Teruel, M., Cabrero, J., Perfectti, F., Alché, J.D., y Camacho, J.P.M. (2009). Abnormal spermatid formation in the presence of the parasitic B₂₄ chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Sexual Development* 3, 284-289.
- Tram, U., y Sullivan, W. (2002). Role of Delayed Nuclear Envelope Breakdown and Mitosis in *Wolbachia*-Induced Cytoplasmic Incompatibility. *Science* 296, 1124-1126.
- Tram, U., Fredrick, K., Werren, J.H., y Sullivan, W. (2006). Paternal chromosome segregation during the first mitotic division determines *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility phenotype. *Journal of Cell Science* 119, 3655-3663.
- Unckless, R.L., y Jaenike, J. (2012). Maintenance of a male-killing *Wolbachia* in *Drosophila innubila* by male-killing dependent and male-killing independent mechanisms *Evolution* 66, 678-689.
- Urwin, R., y Maiden, M.C. (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology* 11, 479-487.
- Ustinova, J., Achmann, R., Cremer, S., y Mayer, F. (2006). Long Repeats in a Huge Genome: Microsatellite Loci in the Grasshopper *Chorthippus biguttulus*. *Journal of Molecular Evolution* 62, 158-167.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., y Shipley, P. (2004). Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535-538.
- Van Oosterhout, C., Weetman, D., y Hutchinson, W.F. (2006). Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. *Molecular Ecology Notes* 6, 255-256.

Vavre, F., Girin, C., y Boulétreau, M. (1999). Phylogenetic status of a fecundity-enhancing *Wolbachia* that does not induce thelytoky in *Trichogramma*. *Insect Molecular Biology* 8, 67-72.

Vázquez, P., Cooper, S.J., Gosálvez, J., y Hewitt, G.M. (1994). Nuclear DNA introgression across a Pyrenean hybrid zone between parapatric subspecies of the grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Heredity* 73 (Pt 4), 436-443.

Virdee, S.R., y Hewitt, G.M. (1992). Postzygotic isolation and Haldane's rule in a grasshopper. *Heredity* 69, 527-538.

Virdee, S.R., y Hewitt, G.M. (1994). Clines for Hybrid Dysfunction in a Grasshopper Hybrid Zone. *Evolution* 48, 392-407.

Volpi, E.V., Pelliccia, F., Lanza, V., Di Castro, M., y Rocchi, A. (1992). Morphological differentiation of a sex chromosome and ribosomal genes in *Asellus aquaticus* (Crust. Isop.). *Heredity* 69, 478-482.

Wade, M.J. (2001). Evolution: Infectious speciation. *Nature* 409, 675-677.

Weeks, A.R., Turelli, M., Harcombe, W.R., Reynolds, K.T., y Hoffmann, A.A. (2007). From Parasite to Mutualist: Rapid Evolution of *Wolbachia* in Natural Populations of *Drosophila*. *PLoS Biology* 5, e114.

Werren, J.H., Zhang, W., y Guo, L.R. (1995). Evolution and Phylogeny of *Wolbachia*: Reproductive Parasites of Arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 261, 55-63.

Werren, J.H. (1997). Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology* 42, 587-609.

Werren, J. (1998). *Wolbachia* and speciation. En *Endless Forms: Species and Speciation*, D. Howard, y S. Berlocher, eds. (Oxford, Oxford University Press), pp. 245-260.

Werren, J.H., y Windsor, D.M. (2000). *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 267, 1277-1285.

Werren, J.H., y Bartos, J.D. (2001). Recombination in *Wolbachia*. *Current biology : CB* 11, 431-435.

Werren, J.H., Baldo, L., y Clark, M.E. (2008). *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* 6, 741-751.

Westerman, M. (1969). Parallel polymorphism for supernumerary segments in *Chorthippus parallelus* (Zetterstedt). II. French populations. *Chromosoma* 26, 7-21.

Westerman, M. (1970). Parallel polymorphism for supernumerary segments in *Chorthippus parallelus* V. A new polymorphism in Europe. *Heredity* 25, 662-667.

Whittaker, J.C., Harbord, R.M., Boxall, N., Mackay, I., Dawson, G., y Sibly, R.M. (2003). Likelihood-Based Estimation of Microsatellite Mutation Rates. *Genetics* 164, 781-787.

Wiesner, K.R., Loxdale, H.D., KÖHler, G., Schneider, A.R.R., Tiedemann, R., y Weisser, W.W. (2011). Patterns of local and regional genetic structuring in the meadow grasshopper, *Chorthippus parallelus* (Orthoptera: Acrididae), in Central Germany revealed using microsatellite markers. *Biological Journal of the Linnean Society* 103, 875-890.

Woodruff, D.S. (1989). Genetic anomalies associated with *Cerion* hybrid zones: the origin and maintenance of new electromorphic variants called hybridzymes. *Biological Journal of the Linnean Society* 36, 281-294.

Wright, S. (1949). The genetical structure of populations. *Annals of Human Genetics* 15, 323-354.

Wu, M., Sun, L.V., Vamathevan, J., Riegler, M., Deboy, R., Brownlie, J.C., McGraw, E.A., Martin, W., Esser, C., Ahmadinejad, N., y col. (2004). Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* *wMel*: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biology* 2, e69.

Xiao, J.-H., Wang, N.-X., Murphy, R.W., Cook, J., Jia, L.-Y., y Huang, D.-W. (2012). *Wolbachia* infection and dramatic intraspecific mitochondrial DNA divergence in a fig wasp. *Evolution* 66, 1907-1916.

Yen, J.H., y Barr, A.R. (1971). New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature* 232, 657-658.

Zabal-Aguirre, M., Arroyo, F., y Bella, J.L. (2010). Distribution of *Wolbachia* infection in *Chorthippus parallelus* populations within and beyond a Pyrenean hybrid zone. *Heredity* 104, 174-184.

Zabalou, S., Apostolaki, A., Pattas, S., Veneti, Z., Paraskevopoulos, C., Livadaras, I., Markakis, G., Brissac, T., MervBot, H., y Bourtzis, K. (2008). Multiple Rescue Factors Within a *Wolbachia* Strain. *Genetics* 178, 2145-2160.

Zhang, D.-X., Yan, L.-N., Ji, Y.-J., Hewitt, G., y Huang, Z.-S. (2009). Unexpected relationships of substructured populations in Chinese *Locusta migratoria*. *BMC Evolutionary Biology* 9, 144.

Zhou, W., Rousset, F., y O'Neil, S. (1998). Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proceedings Biological sciences* 265, 509-515.

APÉNDICE 1

Genotipos obtenidos para los microsatélites H5, H12, G5, F9, F1, D7, D6 y D2 en 100 individuos analizados. Los números son los códigos de los diferentes alelos. Los interrogantes indican datos no obtenidos. Poblaciones: Es, Escarrilla; PV1, Puerto Viejo de Sallent 1; PV3, Puerto Viejo de Sallent 3; PV5, Puerto Viejo de Sallent 5; Ga, Gabas.

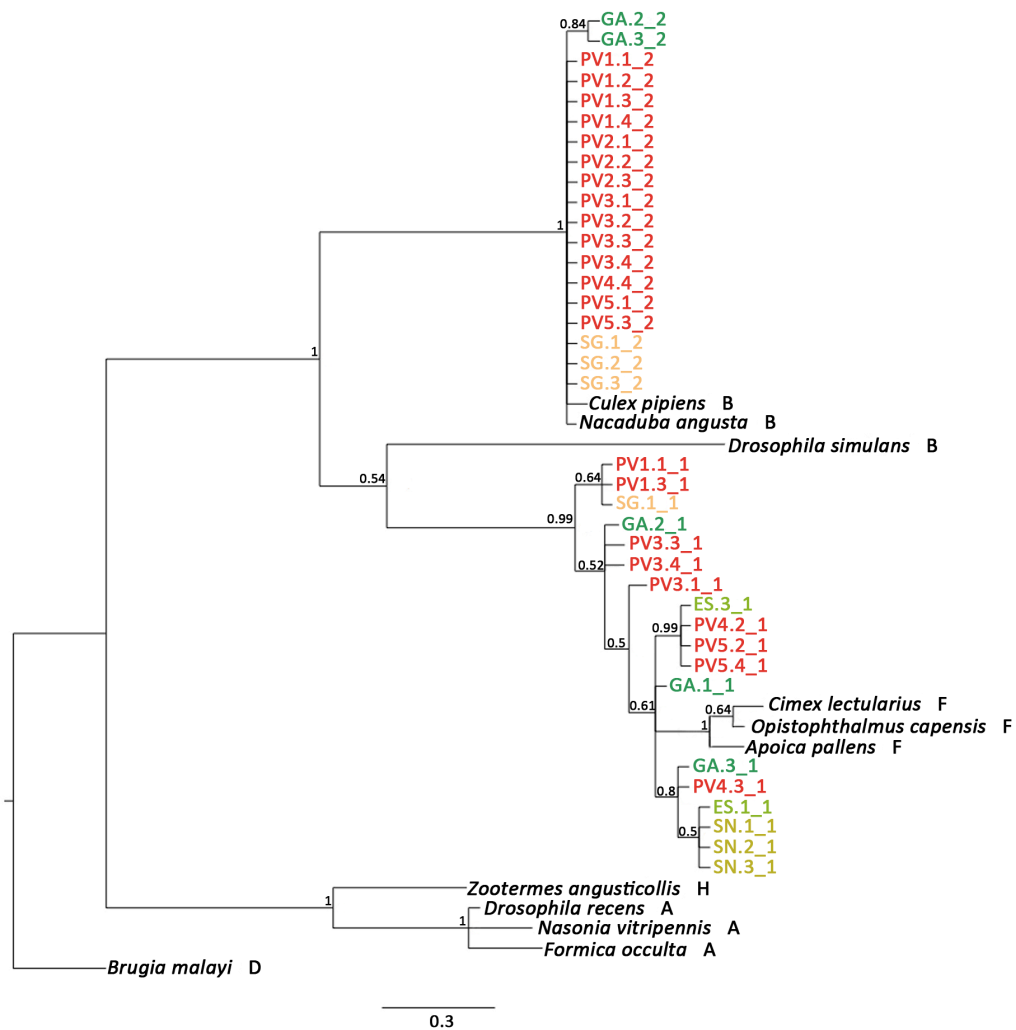
		LOCUS															
		H5		H12		G5		F9		F1		D7		D6		D2	
Población	Individuo	Alelos		Alelos		Alelos		Alelos		Alelos		Alelos		Alelos		Alelos	
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
ES	1	319	323	162	180	266	319	200	226	232	234	334	326	288	290	420	438
	2	316	323	155	155	247	249	206	242	213	213	307	309	214	214	444	444
	3	315	323	180	192	272	274	200	200	213	213	305	317	268	288	?	?
	4	323	323	164	192	274	276	206	206	232	234	320	328	266	280	?	?
	5	?	?	168	171	243	291	?	?	227	227	307	309	286	288	?	?
	6	323	327	155	192	264	286	200	246	213	219	305	324	284	286	?	?
	7	315	315	192	192	258	276	200	206	?	?	317	337	266	280	?	?
	8	315	323	174	192	274	276	200	218	211	211	305	323	298	300	427	450
	9	316	323	180	197	275	275	200	200	223	230	307	309	274	274	200	438
	10	316	316	162	164	313	315	206	206	211	238	307	309	244	244	427	427
	11	315	315	162	167	276	278	206	224	215	234	317	323	288	292	?	?
	12	315	327	164	164	?	?	198	198	228	230	317	321	292	294	344	432
	13	323	323	?	?	?	?	206	206	228	230	305	305	292	294	206	422
	14	315	327	164	164	274	276	224	224	219	223	305	312	260	268	224	426
	15	323	323	155	167	249	251	200	216	211	238	305	318	212	288	?	?
	16	315	315	164	192	245	247	200	216	219	238	305	318	286	298	432	432
	17	315	315	315	315	273	275	224	224	236	238	315	325	288	288	438	438
	18	315	323	164	194	276	278	198	224	225	238	307	309	266	266	438	438
	19	315	315	164	170	274	286	200	206	213	227	305	328	272	272	200	440
	ES	20	315	323	194	194	245	247	200	200	219	225	307	317	286	294	200
PV1	1	315	327	260	260	?	?	228	228	211	211	307	307	260	260	?	?
PV1	2	313	323	155	170	256	256	190	216	211	211	303	307	282	284	427	427
PV1	3	323	327	164	164	272	274	203	203	215	217	307	309	265	265	204	204
PV1	4	323	323	164	187	258	258	208	216	213	213	307	309	261	278	?	?
PV1	5	323	323	155	197	251	252	190	224	210	278	303	307	278	280	?	?
PV1	6	315	315	164	164	245	245	203	228	213	287	307	311	270	270	416	422
PV1	7	323	323	164	170	256	282	204	228	217	217	303	307	260	268	204	228
PV1	8	315	323	164	164	252	252	208	216	185	217	303	307	276	278	440	440
PV1	9	323	327	162	162	258	268	203	228	213	213	307	311	274	276	416	422
PV1	10	323	327	162	162	258	268	202	227	213	213	307	309	274	276	?	?
PV1	11	323	323	155	164	315	317	216	224	217	217	307	311	260	260	416	422
PV1	12	319	327	?	?	?	?	?	?	217	217	?	?	217	217	?	?
PV1	13	315	327	162	164	256	256	180	204	217	217	289	307	278	284	416	416
PV1	14	316	327	164	197	?	?	212	228	?	227	307	307	274	276	416	422
PV1	15	327	327	155	191	272	274	204	228	211	215	289	307	278	284	?	?
PV1	16	316	327	164	164	264	264	190	202	217	217	307	311	217	282	?	?
PV1	17	319	319	162	164	251	254	228	228	213	213	?	?	278	280	438	438
PV1	18	323	323	164	164	254	315	204	224	221	272	303	307	260	280	416	422
PV1	19	323	323	164	164	?	?	203	203	240	242	303	307	268	278	416	422
PV1	20	?	?	?	?	256	256	216	216	240	242	309	311	280	280	?	?

Continúa en la página siguiente.

		LOCUS															
		H5		H12		G5		F9		F1		D7		D6		D2	
Población	Individuo	Alelos		Alelos		Alelos		Alelos		Alelos		Alelos		Alelos		Alelos	
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
PV3	1	323	323	164	174	180	180	200	228	215	217	307	309	270	308	416	416
	2	319	319	162	167	249	249	203	228	215	215	289	307	261	278	422	422
	3	323	323	164	164	258	286	216	228	217	217	307	307	278	278	408	438
	4	316	323	180	197	247	247	203	228	217	217	307	311	274	276	203	420
	5	315	323	167	170	?	?	203	228	227	244	289	309	286	288	203	427
	6	319	319	164	164	245	306	203	228	208	213	289	307	245	282	427	444
	7	323	323	187	187	180	180	198	204	242	244	287	307	278	280	?	?
	8	323	323	155	162	236	245	180	203	217	221	289	307	?	?	?	?
	9	323	323	162	162	247	272	200	218	265	267	307	307	278	278	438	438
	10	323	323	164	164	236	256	204	230	217	217	289	307	278	278	422	422
	11	323	327	162	164	274	274	226	230	213	213	291	307	245	282	450	450
	12	323	323	162	164	260	260	203	230	215	217	289	307	260	290	408	408
	13	315	323	315	323	256	282	196	208	217	217	307	307	?	?	422	422
	14	323	327	?	?	252	260	228	228	213	213	307	309	280	280	432	432
	15	323	323	162	164	251	251	204	228	213	221	303	307	?	?	?	?
	16	323	323	164	170	260	260	180	180	217	217	289	307	278	278	422	422
	17	316	323	164	170	256	314	228	228	215	215	289	303	278	280	416	416
	18	323	327	164	164	270	272	204	228	208	219	307	307	280	325	422	438
	19	316	327	155	162	247	282	196	203	210	217	289	307	270	270	?	?
	20	323	323	161	164	300	302	203	228	211	211	307	309	276	278	?	?
PV5	1	323	323	?	?	279	312	228	228	215	225	303	307	247	278	?	?
	2	316	316	162	162	?	?	203	207	206	217	?	?	260	260	432	432
	3	323	323	247	322	274	276	216	228	217	225	289	307	247	278	?	?
	4	327	327	266	326	252	252	203	203	217	230	289	309	266	266	?	?
	5	323	323	322	322	247	270	208	228	223	223	289	309	310	312	408	408
	6	323	323	164	191	?	?	208	228	230	230	307	309	263	263	?	?
	7	323	323	162	164	276	286	203	254	190	208	289	307	263	263	422	422
	8	323	327	164	174	276	276	203	228	185	185	307	309	249	310	422	422
	9	319	323	288	288	284	286	190	228	217	250	303	307	288	288	422	422
	10	315	323	200	200	236	242	202	246	185	211	303	307	?	?	?	?
	11	323	323	162	176	254	254	180	203	213	217	307	309	270	270	?	?
	12	315	323	164	200	256	312	203	208	213	213	303	309	276	278	422	422
	13	315	323	162	164	249	260	211	220	223	223	307	311	247	251	438	438
	14	323	323	164	164	276	276	180	216	227	227	291	307	282	290	422	422
	15	323	323	162	164	260	270	216	216	217	217	289	307	?	?	?	?
	16	323	323	161	161	316	318	203	228	217	230	289	307	270	270	408	408
	17	323	323	161	161	254	254	203	228	217	230	289	309	270	270	?	?
	18	315	316	?	?	274	274	220	228	217	236	289	307	274	276	?	?
	19	323	323	162	164	236	236	211	228	217	217	289	307	263	263	?	?
	20	323	323	162	170	?	?	202	202	217	217	291	307	264	282	?	?
GA	1	323	327	182	182	292	292	204	205	210	232	307	307	274	276	462	462
	2	?	?	180	180	286	288	195	203	210	232	305	307	274	290	422	422
	3	323	323	180	188	258	266	203	211	190	219	307	307	265	286	424	424
	4	191	323	182	193	258	266	203	203	190	232	305	307	258	282	462	462
	5	323	323	182	193	258	266	?	?	190	232	305	307	258	282	462	462
	6	323	323	151	182	286	286	204	214	217	217	311	322	218	218	?	?
	7	191	327	?	?	247	247	224	260	190	190	307	307	258	306	427	444
	8	323	323	180	180	?	?	195	217	190	190	311	322	302	304	462	462
	9	323	323	180	180	247	247	200	204	190	232	332	332	264	266	456	456
	10	323	327	182	182	286	286	195	211	190	204	330	332	264	302	422	422
	11	323	323	?	?	256	286	205	205	190	213	307	311	290	290	432	444
	12	323	323	322	322	247	247	205	205	190	210	307	311	288	304	205	205
	13	323	323	160	180	?	?	204	224	210	210	307	307	265	284	?	?
	14	323	327	168	168	241	241	228	228	190	211	318	332	274	276	229	450
	15	323	323	180	182	247	300	204	211	190	217	303	307	265	265	210	450
	16	323	323	193	193	241	241	204	211	210	210	?	?	302	304	456	456
	17	323	323	182	265	286	286	203	204	185	185	332	334	265	265	427	450
	18	323	323	180	193	245	247	203	211	190	217	332	334	258	258	419	425
	19	323	327	282	323	256	286	204	206	210	236	?	?	280	282	422	422
	20	327	327	182	182	245	286	?	?	190	210	324	326	240	265	440	440

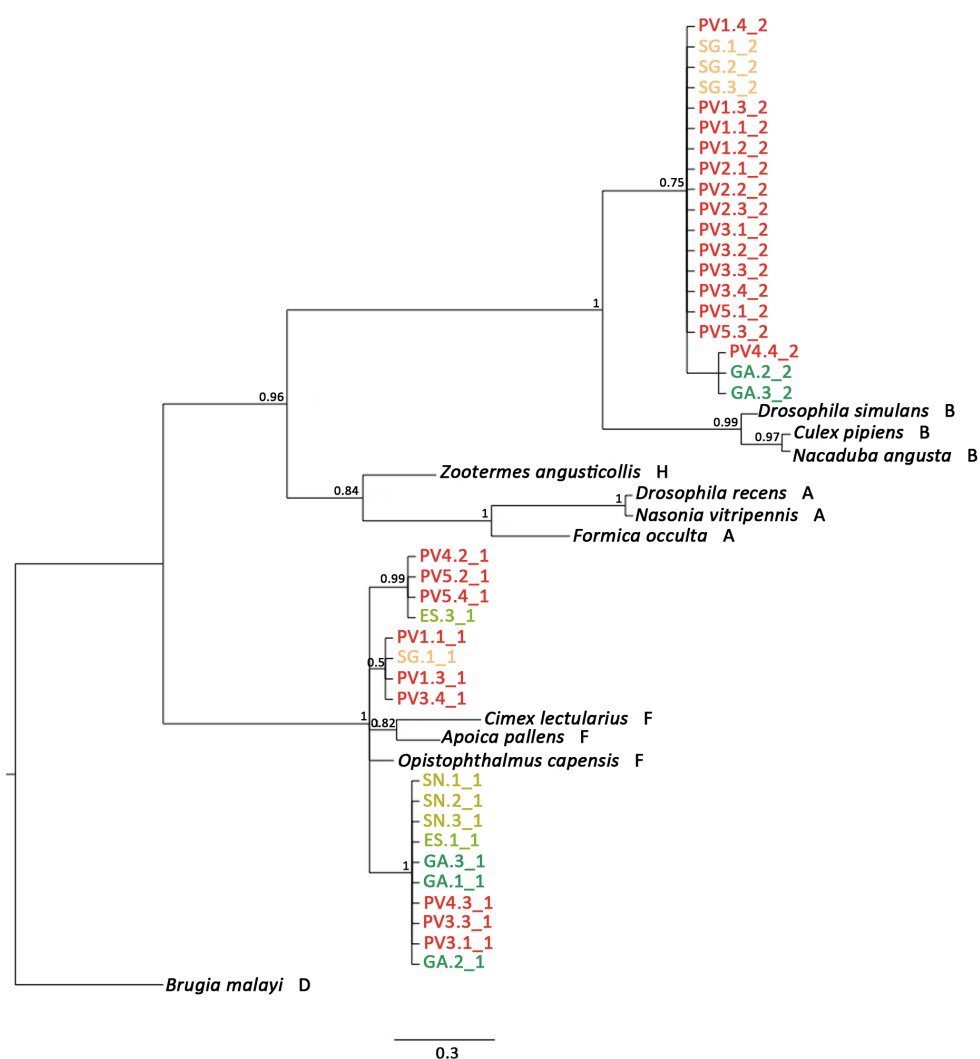
APÉNDICE 2

Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana a partir del alineamiento de secuencias del gen *coxA*. Las letras al final del nombre de las especies de hospedadores indican el supergrupo de *Wolbachia* al que pertenecen. Las secuencias originales de este trabajo son las que están expresadas mediante un código en el que las letras hacen referencia a la población, y el número al individuo. PV, Puerto Viejo; GA, Gabas; SG, Sallent de Gállego; SN, Sierra Nevada.



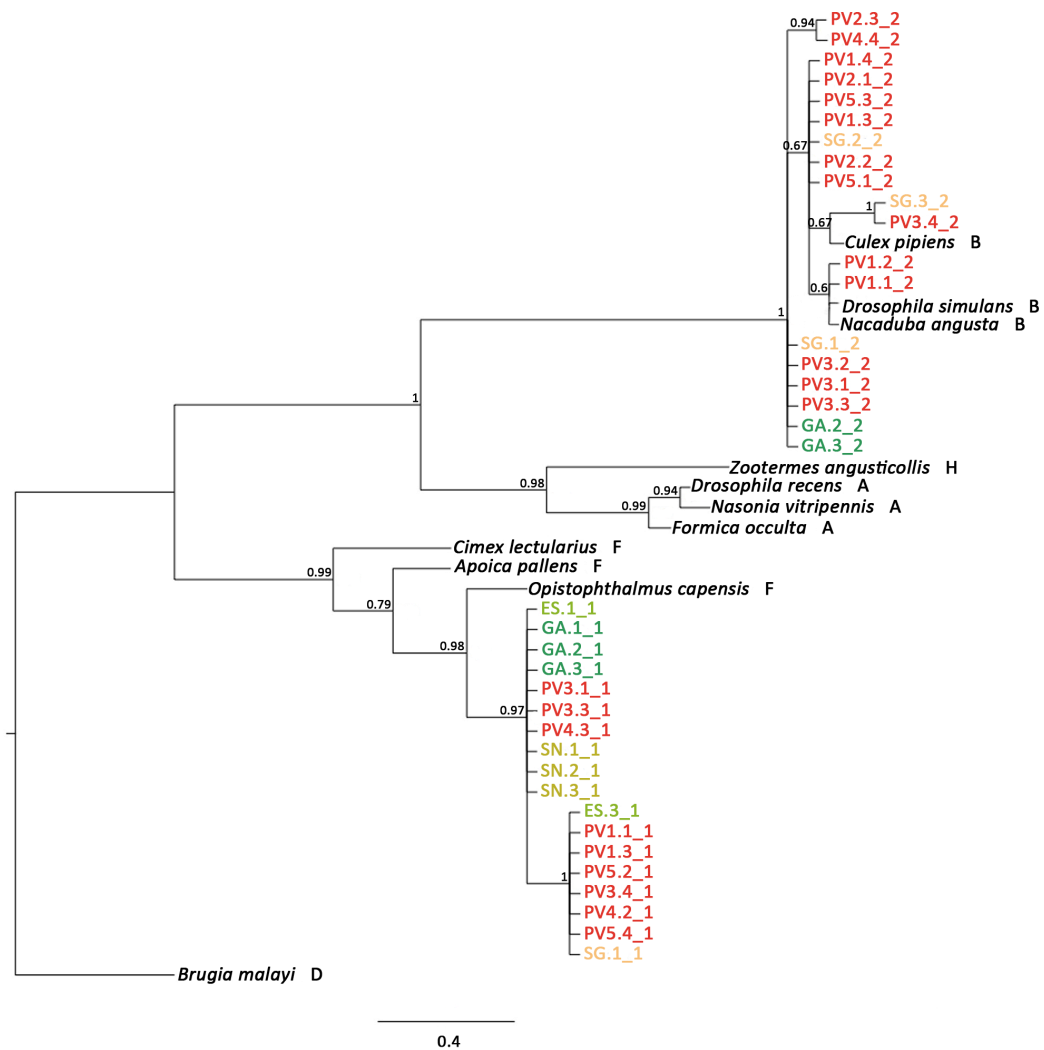
APÉNDICE 3

Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana a partir del alineamiento de secuencias del gen *fbpA*. Las letras al final del nombre de las especies de hospedadores indican el supergrupo de *Wolbachia* al que pertenecen. Las secuencias originales de este trabajo son las que están expresadas mediante un código en el que las letras hacen referencia a la población, y el número al individuo. PV, Puerto Viejo; GA, Gabas; SG, Sallent de Gállego; SN, Sierra Nevada.



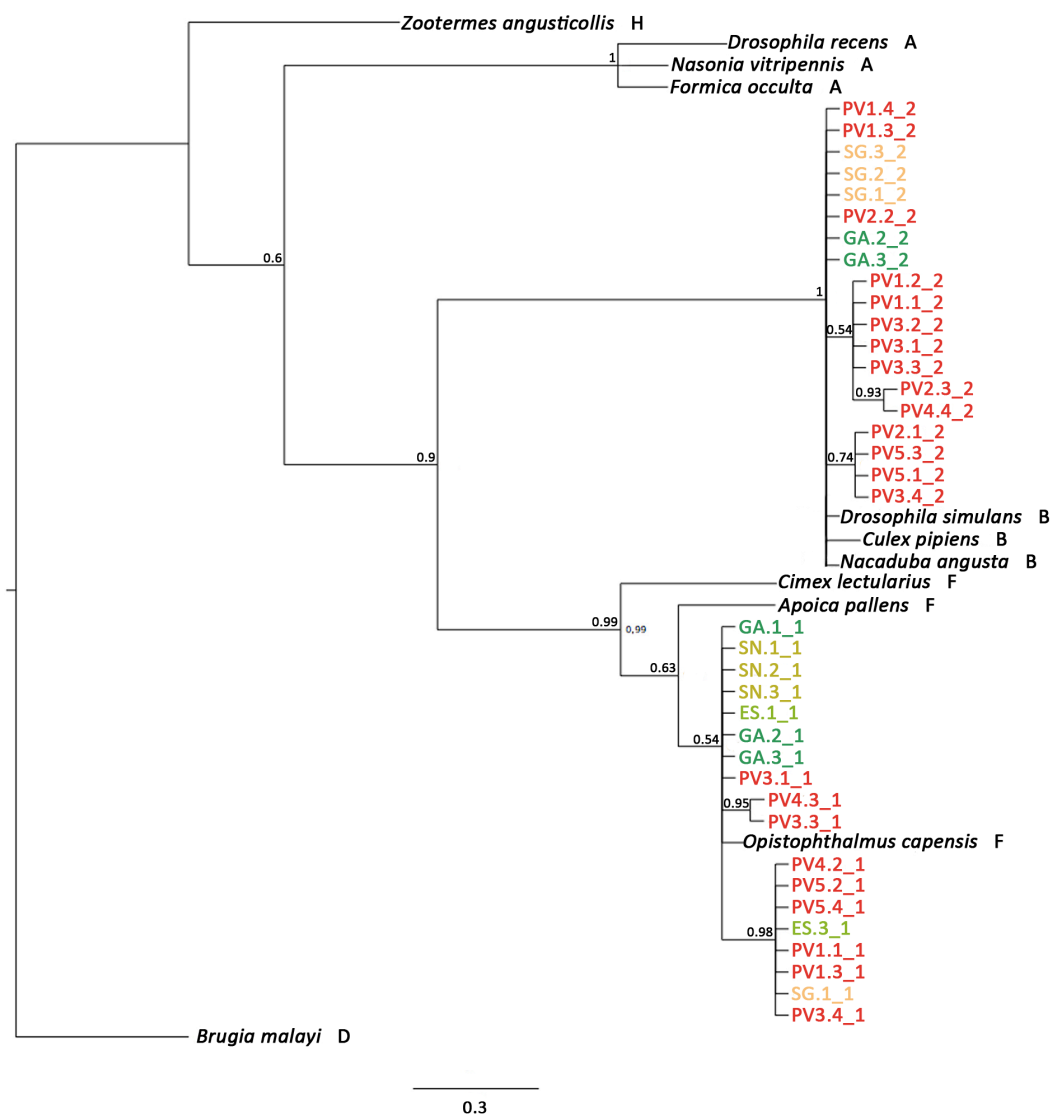
APÉNDICE 4

Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana a partir del alineamiento de secuencias del gen *ftsZ*. Las letras al final del nombre de las especies de hospedadores indican el supergrupo de *Wolbachia* al que pertenecen. Las secuencias originales de este trabajo son las que están expresadas mediante un código en el que las letras hacen referencia a la población, y el número al individuo. PV, Puerto Viejo; GA, Gabas; SG, Sallent de Gállego; SN, Sierra Nevada.



APÉNDICE 5

Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana a partir del alineamiento de secuencias del gen *gatB*. Las letras al final del nombre de las especies de hospedadores indican el supergrupo de *Wolbachia* al que pertenecen. Las secuencias originales de este trabajo son las que están expresadas mediante un código en el que las letras hacen referencia a la población, y el número al individuo. PV, Puerto Viejo; GA, Gabas; SG, Sallent de Gállego; SN, Sierra Nevada.



APÉNDICE 6

Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana a partir del alineamiento de secuencias del gen *hcpA*. Las letras al final del nombre de las especies de hospedadores indican el supergrupo de *Wolbachia* al que pertenecen. Las secuencias originales de este trabajo son las que están expresadas mediante un código en el que las letras hacen referencia a la población, y el número al individuo. PV, Puerto Viejo; GA, Gabas; SG, Sallent de Gállego; SN, Sierra Nevada.

